

B33

RECEPTOR PROTEIN FOR PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

Patent number: JP61293924
Publication date: 1986-12-24
Inventor: NIITSU YOJIRO; others: 02
Applicant: ASAHI CHEM IND CO LTD
Classification:
- **international:** A61K37/02; A61K35/12; A61K35/74; A61K37/04;
C07K15/06; C12P21/00
- **european:**
Application number: JP19850136729 19850623
Priority number(s):

Abstract of JP61293924

PURPOSE:To provide the titled receptor protein having the properties of novel cancer-specific antigen common to a wide variety of cancer cells and useful as an antigen to obtain an antibody for the development of novel method for the diagnosis and remedy for cancer.

CONSTITUTION:The receptor protein of physiologically active substance (e.g. rabbit TNF, hyman TNF, etc.), having cytotoxic activity against L-M cell and causing hemorrhagic necrosis reaction to the tumor part when administered to BALB/c mouse transplanted with Meth A Sarcoma cancer cell. The protein has a molecular weight of 95,000+ or -10,000 (SDS-polyacrylamide electrophoresis) and forms a both with a physiologically active substance having a dissociation constant of 1×10^{-9} - 1×10^{-10} . It can be separated by subjecting the membrane fraction of a cell sensitive to the physiological active substance to the purification process including the affinity chromatography using an affinity adsorbent produced by immobilizing said physiologically active substance on a carrier.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

⑮ Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 昭和61年(1986)12月24日
A 61 K 37/02		7138-4C	
		7138-4C	
		7138-4C	
		7138-4C	
C 07 K 15/06		8318-4H	
C 12 P 21/00		6712-4B	
// C 12 N 15/00		7115-4B	審査請求 未請求 発明の数 5 (全44頁)

⑭ 発明の名称 生理活性物質の受容タンパク

⑯ 特 願 昭60-136729

⑰ 出 願 昭60(1985)6月23日

⑱ 発 明 者 新 津 洋 司 郎 札幌市中央区北1条西15丁目 大通ハイム601号
 ⑱ 発 明 者 漆 崎 一 朗 札幌市中央区双子山2丁目4
 ⑱ 発 明 者 林 紘 富士市今泉3989の1
 ⑲ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

明 細 書

1. 発明の名称

生理活性物質の受容タンパク

2. 特許請求の範囲

(1) L-M細胞に対して細胞障害性を有し且つ
 メス エイ ザルコーマ (Meth A Sarcoma) 癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質の受容タンパク。

(2) 該生理活性物質がTNFであることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の受容タンパク。

(3) 該生理活性物質が遺伝子組換え体より生産されたものであることを特徴とする特許請求の範囲第1項又は第2項記載の受容タンパク。

(4)

a) 分子量 95,000±10,000(SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法)

b) 生理活性物質との結合における解離定数
 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-10}$

の特性を有することを特徴とする特許請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の受容タンパク。

(5) L-M細胞に対して細胞障害性を有し、かつメス エイ ザルコーマ癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質に感受性のある細胞より単離された該生理活性物質受容タンパク。

(6) 該生理活性物質がTNFであることを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の受容タンパク。

(7) 生理活性物質に感受性のある細胞が脊椎動物由来であることを特徴とする特許請求の範囲第5項又は第6項記載の受容タンパク。

(8) L-M細胞に対して細胞障害性を有し、且つメス エイ ザルコーマ癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質に感受性のある細胞から得た該感受性細胞の膜成分を該生理活性物質を担体に固定させて得られる親和性吸着体を用いるアフィニティークロマトグ

ラフィーを含む精製処理に付すことを特徴とする該生理活性物質の受容タンパクの単離方法。

(9)該生理活性物質がTNFであることを特徴とする特許請求の範囲第10項記載の方法。

(10)生理活性物質に感受性のある細胞が脊椎動物由来であることを特徴とする特許請求の範囲第8項又は第9項のいずれかに記載の方法。

(11)L-M細胞に対して細胞障害性を有し且つメス エイ ザルコーマ癌細胞を移植した BALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質の受容タンパクに対する抗体。

(12)L-M細胞に対して細胞障害性を有し且つメス エイ ザルコーマ癌細胞を移植した BALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質に対する抗体の放射性元素標識体。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、生理活性物質の受容タンパクに関するものである。更に詳細には、本発明は、L-M細胞

胞に対して細胞障害性を有しかつ メス エイ ザルコーマ(Meth A Sarcoma)癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質の受容タンパクに関するものである。

本明細書において、アミノ酸、ペプチドはIUPAC-IUB生化学命名委員会(CBN)で採用された略記法により表示され、例えば下記の略号が使用される。なお、アミノ酸などに関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

Cys : システイン残基

Gln : グルタミン残基

Asp : アスパラギン酸残基

Pro : プロリン残基

Tyr : チロシン残基

Val : バリン残基

Lys : リジン残基

Glu : グルタミン酸残基

Ala : アラニン残基

Asn : アスパラギン残基

Leu : ロイシン残基

Phe : フェニルアラニン残基

Gly : グリシン残基

His : ヒスチジン残基

Ser : セリン残基

Thr : スレオニン残基

Ile : イソロイシン残基

Trp : トリプトファン残基

Arg : アルギニン残基

Met : メチオニン残基

また、本明細書中においてDNAのポリマーまたはオリゴマーは下記の如き略号の配列により表記する。

A : 2'-デオキシアデニル酸

C : 2'-デオキシシチジル酸

G : 2'-デオキシグアニル酸

T : チミジル酸

特にことわらない限り、配列の左から右への方向は5'から3'への方向を示すものとする。

インスリンなどのホルモン、アセチルコリンなどの神経伝達物質、リガ蛋白質、免疫グロブリン、細胞増殖因子などは微量で強力かつ特異的に標的細胞のみに作用をおよぼすことが知られている。近年、これらの生理活性物質の標的細胞への作用機構がさかんに研究されるようになってきた。その結果、インスリンなどの一部の生理活性物質については、標的細胞に生理活性物質と特異的に結合する受容体が存在し、生理活性物質との結合により、受容体が生理活性物質の作用を細胞に及ぼすことが解明されるとともに、受容体を構成するタンパクの単離がなされている。これらのことは、フレイチュット等、バイオケミカル、アンド、バイオフィジカル、リサーチ、コミュニケーションズ、43巻、400(1971)[Freychet et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 43, 400(1971)]及びカトレカサス、プロスィーディングズ、オブ、ザ、ナショナル、アカデミー、オブ、サイエンス、オブ、ユナイテッド、ステイツ、オブ、アメリカ、68巻、246(1971)[Cuatre-

cases, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 68, 246(1971))などに報告されている。

一方、網内系賦活化作用を有する物質の1種または2種以上を哺乳動物(マウス、ウサギ、モルモット等)に投与し、次いでグラム陰性菌由来のエンドトキシンを注射することによって、または哺乳動物由来の活性化マクロファージを含む組織培養系にグラム陰性菌由来のエンドトキシンを加えることによってL-H細胞に対して細胞障害性を有し、かつメスエイザルコーマで癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質が誘発されることが知られており、後述するように、この生理活性物質の単離、精製及び遺伝子工学的手法での製造が行われるようになってきた。上記の生理活性物質は、正常細胞に対してほとんど障害性を有さず、腫瘍細胞のみを壊死させる性質があることから新しい制癌剤として期待されている。該生理活性物質が微量で癌細胞

のみを特異的に障害することについて、その作用機構の解明については現在に至るまで何らなされていなかった。この理由として、上記生理活性物質の精製が難しく、生理活性物質の作用機構解明に必要な高度に精製されたものがなかったこと、及びクロラミンT法など従来一般に行われている生理活性物質標識方法で放射性同位元素を標識した場合、該生理活性物質が失活してしまうなどの極めて困難な諸問題が挙げられる。

本発明者は、該生理活性物質の癌細胞に対する作用機構について鋭意研究を重ねた結果、該生理活性物質を特異的に認識する受容タンパクが、該生理活性物質に対して感受性の癌細胞にのみ存在し、正常細胞にはほとんど存在しないことを見出し、正常細胞にはほとんど存在しないことを見出すとともに、該生理活性物質の受容タンパクの単離に成功した。すなわち、本発明者等は、該生理活性物質及び該生理活性物質のモノクローナル抗体を用いた免疫染色法及び該生理活性物質の存在下における ^{32}P -ATP(アデノシン5'-三リン酸)での該生理活性物質に感受性のある癌細胞の処理

により、該生理活性物質に感受性のある細胞の細胞膜に、該生理活性物質と特異的に結合する受容タンパクが存在し、正常細胞にはほとんど存在しないことを見出した。又、本発明者等は鋭意研究の結果、該生理活性物質の生理活性を維持した状態で放射性同位元素の標識体を得ることに成功し、それを利用して該生理活性物質受容タンパクの諸特性を知見した。更に本発明者等は、該生理活性物質に感受性のある細胞の膜面分を、該生理活性物質を担体に固定させて得られる親和性吸着体を用いるアフィニティークロマトグラフィーを含む精製処理に付すことにより該生理活性物質の受容タンパクを単離できることを見出した。本発明は上記の知見に基づきなされたものである。

即ち、本発明によれば、L-H細胞に対して細胞障害性を有しかつメスエイザルコーマ癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質の受容タンパクが提供される。更に本発明によれば、L-H細胞に対して細胞障害性

を有しかつメスエイザルコーマ癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質に感受性のある細胞より単離された該生理活性物質の受容タンパクが提供される。更にまた本発明によれば、L-H細胞に対して細胞障害性を有しかつメスエイザルコーマ癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合にその腫瘍部位に出血性壊死反応を起こさせる性質を有する生理活性物質に感受性のある細胞の膜面分を、該生理活性物質を担体に固定させて得られる親和性吸着体を用いるアフィニティークロマトグラフィーに付すことを含む精製処理に付けることを特徴とする該生理活性物質の受容タンパクの単離方法が提供される。

本発明でいう生理活性物質は、L-H細胞に対して細胞障害性を有し、メスエイザルコーマ癌細胞を移植したBALB/cマウスに投与した場合、腫瘍部位に出血性の壊死反応を起こさせる性質を有する。また、この生理活性物質は、*in vitro*で

正常細胞にはほとんど有害な作用をおよぼさないという特徴をもつ。このような性質を有する生理活性物質としては、種々の高等動物由来のものが知られており、これらは腫瘍壊死因子(以下TNFと称す)と命名された。種々のTNFうち、特にウサギ由来及びヒト由来のものについてはその構造も明らかにされ、組換えDNA技術による大量生産技術が確立されている。

次にまず、ウサギTNFについて説明する。ウサギTNFは少なくとも下記のアミノ酸配列を有するものである。

Ser Ala Ser Arg Ala Leu Ser Asp Lys Pro
Leu Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Val
Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Ser Gln Arg
Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Lys
Leu Thr Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ala
Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val
Leu Phe Ser Gly Gln Gly Cys Arg Ser Tyr
Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser Arg Phe
Ala Val Ser Tyr Pro Asn Lys Val Asn Leu

プチドが前記ウサギ成熟TNFのN-末端側に結合しているものも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

前記したウサギTNFは次の如き塩基配列を有するDNAを用いて組換えDNA技術により得ることができる。

TCA GCT TCT CGG GCC CTG AGT GAC AAG CCT
CTA GCC CAC GTA GTA GCA AAC CCG CAA GTG
GAG GGC CAG CTC CAG TGG CTG AGC CAG CGT
GCG AAC GCC CTG CTG GCC AAC GGC ATG AAG
CTC ACG GAC AAC CAG CTG GTG GTG CCG GCC
GAC GGG CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTT
CTC TTC AGC GGT CAA GGC TGC CGC TCC TAC
GTG CTC CTC ACT CAC ACT GTC AGC CGC TTC
GCC GTC TCC TAC CCG AAC AAG GTC AAC CTC
CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAC CGG
GAG ACC CCC GAG GAG GCT GAG CCC ATG GCC
TGG TAC GAG CCC ATC TAC CTG GGC GGC GTC
TTC CAG TTG GAG AAG GGT GAC CGG CTC AGC
ACC GAG GTC AAC CAG CCT GAG TAC CTG GAC

Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys His Arg
Glu Thr Pro Glu Glu Ala Glu Pro Met Ala
Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val
Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser
Thr Glu Val Asn Gln Pro Glu Tyr Leu Asp
Leu Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly
Ile Ile Ala Leu

上記アミノ酸配列を有するウサギTNFは、ウサギ成熟TNFとも称される。

又、前記アミノ酸配列を有するウサギTNFのN-末端にメチオニン残基がペプチド結合しているものも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

更に又、ATGAGCACTGAGAGTATGATCCGGGACGTCGAGC
TGGCGGAGGGGCCGCTCCCCAAGAAGGCAGGGGGGGCCCCAGGGC
TCCAAGCGTTGGCTCTGCGCTCAGCCTCTTCTCTTTCTGCTCGT
GGCTGGAGCCACCACGCTCTTCTGCGCTGCTGCACCTTCAGGGTGA
TCGGCCCTCAGGAGGAAGAGCAGTCCCCAAACAACCTCCATCTA
GTCAACCTGTGGCCAGATGGTCACCTCAGAの塩基配列
で示されるDNAから導かれるアミノ酸配列で示さ
れるペプチドのC-末端を含む一部または全部のペ

CIT GCC GAG TCC GGG CAG GTC TAC TTT GGG
ATC ATT GCC CTG

ウサギTNFを成熟形で組換えDNA技術により微生物もしくは細胞の培養により産生せしめるためには、上記塩基配列の5' 端にATGを付加した構造を有するDNAを含む遺伝子組換体を用いることができる。

更に又、ATGAGCACTGAGAGTATGATCCGGGACGTCGAGC
TGGCGGAGGGGCCGCTCCCCAAGAAGGCAGGGGGGGCCCCAGGGC
TCCAAGCGTTGGCTCTGCGCTCAGCCTCTTCTCTTTCTGCTCGT
GGCTGGAGCCACCACGCTCTTCTGCGCTGCTGCACCTTCAGGGTGA
TCGGCCCTCAGGAGGAAGAGCAGTCCCCAAACAACCTCCATCTA
GTCAACCTGTGGCCAGATGGTCACCTCAGAの塩基配列
で示されるDNAの3'-末端を含む一部または全部
のDNAがウサギTNFをコードする前記塩基配列の
5'-末端側に結合しているDNAを含む遺伝子組換
体を用いて得られるポリペプチドも本発明でいう
生理活性物質に含まれる。

更に又、自然の変異によりまたは人工的変異により、主たる活性に変化を与えることなく、蛋白質の構造の一部を変異せしめることが可能であり、

前記したすべてのウサギ由来のポリペプチドまたはその誘導体ペプチドの相同変異に相当する構造を有するポリペプチドをも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

上記ウサギTNFは、例えば特願昭59-19850号明細書に記載されている方法で製造することができる。その概略は次の通りである。

(以下余白)

1. ウサギを網内系賦活化作用を有する物質により刺激する。

2. 前記ウサギを5～15日間飼育した後、グラム陰性菌のエンドトキシンで処理し、その血清を取得する。この血清はL細胞障害活性及び抗腫瘍活性を示す(この活性を示す物質を血清TNFと称する)。

3. 網内系賦活化作用を有する物質により刺激されたウサギを5～15日間飼育した後、気管切開により肺胞洗浄細胞を得る。

4. 肺胞洗浄細胞を、グラム陰性菌より得たエンドトキシンと共に培養する。

5. 前記細胞培養の上清中にL細胞障害活性が認められる。この活性は、血清TNFをマウスに処理して得られる抗血清(以下抗TNF抗体と称する)により消去される。エンドトキシンを共存させない細胞培養上清中にはL細胞障害活性は認められない。

6. 前記細胞培養中に放射性メチオニンを共存させて得られる上清をSDS-ポリアクリルアミドゲ

ル電気泳動で分析することにより、分子量17500±2000の蛋白の生成が認められる。エンドトキシンを共存させない細胞培養上清にはこの蛋白の生成は、認められない。

7. 前記細胞培養の上清をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画すると分子量17500±2000の位置にL細胞障害活性が認められる。血清TNFのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動分析もこれに一致する。

8. 前記細胞培養から細胞を集め、リボヌクレアーゼ阻害剤の存在下に、細胞質リボヌクレイン酸(以下、RNAと略す)を抽出する。

9. 細胞質RNAから、オリゴdTカラムに対する吸着性画分(以下mRNA(メッセンジャーRNA)と略す)を得る。

10. 上記mRNAをシ³²糖密度勾配遠心により分画する。

11. 上記分画をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、培養し、培地および卵母細胞中にL細胞障害活性を示す分画を集める。

12. 上記アフリカツメガエル卵母細胞中に生成するL細胞障害活性は、抗TNF抗体により消去される。

13. 分画されたmRNAを、これに相補的な一重鎖DNAに転換し、これから更に二重鎖DNAを調整する。この3'-末端にデオキシシチジル酸のオリゴマーを付加せしめ、1つ又は複数の表現型マーカーを有するプラスミドのようなベクターの中に挿入する。

14. このように調製されたベクターを使用し、大腸菌細胞を形質転換して、mRNAに相補的なDNAを含有する大腸菌12000株を得る。

15. 血清TNFを精製し、そのアミノ酸配列を定める。

16. 血清TNFのアミノ酸配列に基きオリゴヌクレオチドを合成し、これを放射線標識する。

17. 14で調製したDNAを移しとった口紙と、16で得た放射線標識されたDNAをハイブリダイズさせ、X線フィルムを強く感光させる株9個を選択する。

18. 17で選択された9個の菌株からプラスミドを単離し、制限酵素で切断し、共通の大きさの断片を有するプラスミドを有する菌株を得る。このうち2株はL細胞障害活性を有する物質を生産することが判明する。

19. この菌株からプラスミドを単離し、塩基配列を決定する。この塩基配列から演繹されるアミノ酸配列の1つは、16で得られたTNFのアミノ酸配列と一致する。

20. TNFのアミノ酸配列を与えるDNA配列を発現ベヒクルの下流に接続し、この発現ベヒクルを適当な宿主細胞を形質転換するために用い、この宿主細胞を培地中で増殖させ、所望のTNFを発現させる。

21. ここに得られたTNF活性は、抗TNF抗体により消去される。

上述の方法においてはウサギTNFの遺伝情報を直接的に示しているmRNAを含有する細胞質RNAは、上記の如くエンドトキシン処理された肺胞洗浄細胞から取得されるが、ウサギの他の細胞例えば末

梢血中のプラスチック吸着性細胞、また末梢血や肝臓、脾臓等のエンドトキシン感受性細胞をエンドトキシン処理することにより得ることができる。

mRNAはまた、染色体DNAを適当なベクターに接続して動物細胞に導入することにより得ることができる。このような系として、SV40をベクターとし、COS細胞を宿主とする組換による方法がよく知られている。[これらのことは例えばマンティ等(Mantel et al), ネイチャー(Nature), 281巻, 40(1979)及びメロン等(Mellon et al), セル(Cell), 27巻, 279(1981)など]に報告されている。

かくして得られたmRNAをcDNAに変換し、プローブを用いるハイブリダイゼーションによって選択されたDNAは、種々の目的に応じて組換えられる。

各アミノ酸に対応するコドン(遺伝暗号)の使用頻度が異なる等の理由により、アミノ酸配列を変えることなく、塩基配列の一部または全部を、有機化学的に合成された人工のDNAに置き換えることも可能である。

ウサギTNFはまた、細胞内で未成熟形態(プレ

またはプレプロペプチド)で産生され成熟過程(プロセッシング)により中間体を經由して成熟TNFとなることが推定される。ウサギTNFのこのような未成熟形態は、TNF遺伝子の塩基配列から推定することができる。未成熟形態及び中間体のウサギTNFをコードする遺伝子もまた、天然のまたは人工的DNAを用いて組換を行うことができる。DNAの組換に際してはウサギTNFをコードする遺伝子を正しく転写、翻訳が行なわれるような配列において、プロモーター等の5'領域の遺伝子配列に接続し、細菌または高等生物細胞中で複製可能なベクターと接続した組換遺伝子をこの組換遺伝子によって細菌または高等生物細胞を形質転換し、この形質転換体を増殖せしめ、TNF遺伝子を発現せしめることによりTNFを得ることができる。

上記のウサギ由来のTNF又はそれから誘導される種々のポリペプチドを組換DNA技術により産生する一つの形態は、メチオニンコドン(ATG)を成熟あるいは未成熟あるいは中間体TNF遺伝子の5'-末端に導入することである。このようにす

ることにより、適当なプロモーターによって合成されるmRNAから成熟あるいは未成熟あるいは中間体TNFが産生される。この様にN末端に付加されたメチオニン残基は宿主によっては自然に除去される。

また別の形態によれば、シグナル配列と呼ばれる疎水性に富んだ配列を付加することにより、宿主細胞の外またはグラム陰性細菌においては、ペリプラズムと呼ばれる部分へ、分泌させることも可能である。

また、開始コドンを組み込んであるベクターの場合は、ベクターから由来するペプチドとTNFとの融合ペプチドを形成するが、この場合は化学的または酵素的に切断するか、もしくはTNFの主たる活性に変化がなければ、そのまま用いることができる。

上記で述べた遺伝子工学的手法によるウサギTNFの製造で用いられる具体的な宿主、ベクター及びプロモーターとしては、後述する遺伝子工学的手法によるヒトTNFの製造において用いられるものを利用することができる。

次にヒトTNFについて説明する。ヒトTNFは少なくとも下記のアミノ酸配列を有するものである。

(以下余白)

Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val
Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly
Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala
Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn
Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu
Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr
Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys
Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys
Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val
Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala
Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala
Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala
Leu

上記アミノ酸配列を有するヒトTNFはヒト成熟TNFとも称される。

前記アミノ酸配列を有するヒトTNFのN-末端にメチオニン残基がペプチド結合しているものも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

前記したヒトTNFは次の如き塩基配列を有するDNAを用いて組換えDNA技術により得ることができる。

TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA
GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG
CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG GCC AAT GCC
CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC
CAG CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC
ATC TAC TCC CAG GTC CTC TTC AAG GGC CAA GGC
TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC
ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG
GTC AAC CTC CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC
CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC AAG
CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC
TTC CAG CTG GAG AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT
GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC TTT GCC
GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC
CTG

ヒトTNFを成熟形で組換えDNA技術により微生物もしくは細胞の培養により産生せしめるため

には、上記塩基配列の5'端にATGを付加した構造を有するDNAを含む遺伝子組換え体を用いることができる。

更に又、自然の変異によりまたは人工的変異により、主たる活性に変化を与えることなく、蛋白質の構造の一部を変異せしめることが可能であり、前記したすべてのヒト由来のポリペプチドまたはその誘導体ペプチドの相同変異に相当する構造を有するポリペプチドをも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

更に又、前記ヒト成熟TNFのN-末端のアミノ酸を4個削除した形のポリペプチドも本発明でいう生理活性物質に含まれる。

上記ヒトTNFは以下のように作製するものである。すなわち、ウサギのTNFのアミノ酸配列構造をもとにヒト染色体遺伝子より、通常の遺伝子組換え操作の手法を使って取り出したDNAを用いて、人工的に新規のDNAを構築し、該DNAを組み込んで目的の遺伝子組換え体を作製する。この製法の詳細は、特願昭39-115496号および特願昭5

9-115497号明細書に記載してある。その概略は次の通りである。

1. バクテリオファージλ/ウサギ染色体遺伝子ライブラリーとバクテリオファージλ/ヒト染色体遺伝子ライブラリーは、ハーバード大学生化学および分子生物学部〔ディヴィニティアベニュー、マサチューセッツ02138、アメリカ(7 Divinity Avenue, Cambridge, Massachusetts 02138, U.S.A)〕のティ・マニアティス(T. Maniatis)教授により調製されたものを用いる。これらのライブラリーは次の方法によって作ることができる。

〔セル(Cell), 15, 687 (1978) 参照〕

(1) ウサギあるいはヒトの組織、たとえばウサギあるいはヒトのすい臓を凍結粉末にし、RNAの蛋白成分を分解処理し、沈澱によってウサギあるいはヒトの高分子DNAを得る。

(2) この高分子DNAは遺伝子座位をランダムに切るために、部分的に分解する。

(3) 得られたDNA断片から分子量分面によって、15から20キロ塩基対(Kb)の大きさ

の断片を得る。

(4) 工程3で得られたDNA断片をλシャロン4 A ファージベクターを用いてクローン化する。

(5) 得られたベクターを、rDNAを含む感染性のファージ粒子にin vitroで組み入れ、上記のウサギあるいはヒトの染色体遺伝子ライブラリーを得る。

2. 後述の参考例2で得られたウサギTNFのcDNAは、ピー・ダブリュ・ジェイ・リグビー(P. W.J. Rigby)らのニックトランスレーション法〔ジェイ・モル・バイオル, 113, 237 (1977) (J. Mol. Biol. 113, 237 (1977))〕によって、³²Pでラベル化する。

3. バクテリオファージλ/ウサギ染色体遺伝子ライブラリーとバクテリオファージλ/ヒト染色体遺伝子ライブラリーのそれぞれを、バクテリアの均一層の上に密にブランクができるように植えつけ、³²PでラベルしたウサギTNFのcDNAとハイブリダイズさせてスクリーニングする。

4. 適合するクローンより、対応するDNAを単離し、制限酵素地図を作り、サザーンハイブリダイズ法〔イー・エム・サザン, ジェイ・モル・バイオル, 98, 503 (1957)〕〔E. M. Southern, J. Mol. Biol., 98, 503 (1975)〕によって解析する。

制限酵素により分解されたウサギTNFとヒトTNFの遺伝子を含む断片を、プラスミドベクター中に導入し、サブクローンした後、塩基配列を解析する。

5. ウサギTNFのcDNAとウサギTNF遺伝子の塩基配列を比較して、ウサギTNF遺伝子のエクソン(ウサギTNFのアミノ酸配列をコードする塩基配列)と、イントロン(ウサギTNFのアミノ酸配列をコードしない塩基配列)を決定する。

6. そして、ウサギTNF遺伝子とヒトTNFの遺伝子を比較して、ヒトTNF遺伝子のエクソンとイントロンを決定する。

7. ウサギTNF遺伝子のイントロンを削除し

エクソンを結合することによって得られた塩基配列より決められるウサギTNFのアミノ酸配列は、ウサギTNFのcDNAの塩基配列より決められるアミノ酸配列と一致することが確認される。

8. 次に、ヒトTNF遺伝子のイントロンを削除し、エクソンを結合することによって得られた塩基配列よりヒトTNFのアミノ酸配列が決められる。ヒトTNFのアミノ酸配列は、ウサギTNFのアミノ酸配列と部分的に一致することが確認される。

9. その後、ヒトTNFをコードするDNAをin vitroで修飾し、適当な発現ベクターに導入し、そのDNAを含む組換えDNAを作製する。組換えDNAは適当な宿主に導入し、これを培養液中で増殖せしめて所望のヒトTNFを発現せしめる。

10. このようにして得られるヒトTNFは成熟形でセリンから始まる155個のアミノ酸残基からなる。それがプレシーケンスにシグナルペプチドを有している場合、シグナルペプチドは非常に

疎水性の性質を有する。

以上は、ヒトTNF遺伝子およびヒトTNFをコードするDNAの取得方法および該DNAを用いるヒトTNFの製造方法を示したものである。

上記において得られるヒトTNFをコードするDNAについては各アミノ酸に対応するコドン(遺伝暗号)の使用頻度が異なる等の理由により、アミノ酸配列を変えることなく、ヒトTNFをコードするDNAの塩基配列の一部または全部を、有機化学的に合成された人工のDNAに置換えることも可能である。

おそらく、ヒトTNFは、プレペプチド又はプレプロペプチドとして未成熟形で細胞内に産生され、プロセッシング段階でプロセスされて中間体を経て、成熟TNFを形成するものと考えられる。ヒトTNFの未成熟形はヒトTNF遺伝子の塩基配列から演繹される。未成熟又は中間体のTNFをコードするDNAからなるTNF DNAは、また天然又は人工合成のDNAと組換えることができる。

ら成熟あるいは未成熟あるいは中間体TNFが産生される。この間にヒトTNFの末端に付加されたメチオニン残基は、宿主によっては自然に除去される。終止コドンを導入する目的はヒトTNF DNAから転写されたmRNAからの翻訳を適当な位置(ヒト由来のポリペプチドまたはその誘導体ペプチドのC末端)で止めることである。

また別の形態によれば、“シグナル配列”と呼ばれる疎水性に富んだ配列を付加することにより、宿主細胞の外またはグラム陰性細菌においては、“ペリプラズム”と呼ばれる部分へ分泌させることも可能である。

また、開始コドンを経込んであるベクターの場合は、ベクターから由来するペプチドとTNFとの融合ペプチドを形成するが、この場合は化学的または酵素的に切断するか、もしくはTNFの主たる活性に酸化がなければ、そのまま用いることができる。

上記で述べた遺伝子工学的手法によるヒトTNFの製造で用いられる具体的な宿主、ベクター及

DNAの組換に際してはヒトTNFをコードする遺伝子を、正しく転写し、それによって得られるmRNAからの翻訳が正しく行われるような配列において、プロモーター等の5'領域の遺伝子配列に接続し、得られたヒトTNF DNA-プロモーター配列を細菌または高等生物細胞中で複製可能なベクターと接続した組換遺伝子を得、この組換遺伝子によって宿主として細菌または高等生物細胞を形質転換し、この形質転換体を増殖せしめ、ヒトTNF遺伝子を発現せしめることによりヒトTNFを得ることができる。

上記のヒト由来のTNF又はそれから誘導される種々のポリペプチドを組換DNA技術により産生する一つの形態は、メチオニンコドン(ATG)を成熟あるいは未成熟あるいは中間体TNF遺伝子の5'-端に導入し、そして3'端にTAAもしくはTAGもしくはTGAの終止コドンと呼ばれるトリプレットを、少なくとも1個導入することである。メチオニンコドンが存在することにより、適当なプロモーターによって合成されるmRNAか

びプロモーターについて以下に記載する。

宿主として大腸菌[*Escherichia coli*] (以下“大腸菌”と記載する)を用いる場合は好適には大腸菌K12株の種々の変異株、例えばHB101(ATCC 33694)、C600K(ATCC33855)、D1210、RR1(ATCC 31343)、MC1061、LE392(ATCC 3572)、JM101(ATCC 33876)、x1776(ATCC 31244)などが用いられる。

大腸菌を宿主とする場合のベクターとしては、pBR322、pBR325、pBR327、pUC8、pUC9、pMB8(ATCC 37019)、pJB8(ATCC 37074)、pKC7(ATCC 37084)等のプラスミドあるいはλgt、λB、シャロン4Aのようなλファージ、M13ファージなどが用いられる。

大腸菌の菌体中に、該生理活性ポリペプチドを産生させるために、大腸菌の遺伝子またはファージ遺伝子のプロモーターが使用される。このようなプロモーターとして、好適にはラクトース分解酵素(LAC)のプロモーター及びそのUV5変

具、ペニシリナーゼ (BLA)、トリプトファン合成酵素 (TRP) のプロモーター、2ファージの P_L プロモーターあるいはトリプトファン合成酵素と、ラクトース分解酵素の融合プロモーターである tac プロモーター等が用いられる。

枯草菌 (バチルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)) (以下“枯草菌”と記載する) を宿主とする場合には、BD170株 (ATCC 33608)、BR151株 (ATCC 33677)、MI112株 (ATCC 33712) などが用いられ、ベクターとしては pC194 (ATCC37034)、pUB110 (ATCC 37015)、pSA2100 (ATCC37014)、pE194などのプラスミドが用いられる。

枯草菌を宿主とする場合のプロモーターとしては、クロラムフェニコールアセチル化酵素 (CAT) やペニシリナーゼ、エリスロマイシン耐性等の遺伝子のプロモーターが用いられる。

酵母を宿主とする場合は、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の RH218株 (ATCC 44076)、SHY 1株 (ATCC 44769)、

SHY 3株 (ATCC 44771)、D131A株、483株、830株などが用いられ、そのベクターとしては YEp13 (ATCC 37115)、YEp6、YRp7、YIp5等のプラスミドが用いられる。

酵母を宿主とする場合、プロモーターとしては酸性ホスファターゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH1)、トリプトファン合成酵素 (TRP)、ホスホグリセレートキナーゼ (PGK)、テトクロームB (COB)、アクチン等の遺伝子のプロモーターが用いられる。

以上のようにして作製した遺伝子組換体で形質転換した微生物を通常の方法で大量に培養した後、目的とする該生理活性物質を産生させる。次いで該生理活性物質を含む微生物菌体の培養上清もしくは、菌体破砕抽出液を原液として、通常の生化学的分離精製方法を組み合わせて精製する。精製方法として、たとえば、硫酸アンモニウムによる塩析法、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過法、電気泳動法、アフィニティークロマトグラフィーなどがあげられる。

$$1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-12}$$

本発明でいう生理活性物質は、上記で述べたウサギあるいはヒト遺伝子組換体より生産される TNF 以外に、従来の方法で、網内系賦活化作用を有する物質を1種または2種以上、ウサギに投与し、次いでグラム陰性菌由来のエンドトキシンを注射することによって、またはウサギ又はヒト由来のマクロファージを含む組織培養系にグラム陰性菌由来のエンドトキシンを加えることによって誘発されて得たウサギ又はヒトの TNF 粗製溶液を陰イオン交換体クロマトグラフィー、ゲルろ過アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動的等電点分離法などの通常の生化学的分離精製方法を組合せて精製したウサギあるいはヒト TNF を包含する。

本発明における生理活性物質の受容タンパクは下記の特性を有する。

a) 分子量 $95,000 \pm 10,000$ (SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法)

b) 生理活性物質との結合における解離定数

本発明における生理活性物質受容タンパクは、該生理活性物質に感受性を示す細胞から単離することができる。該生理活性物質感受性細胞としては、魚類、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類などの脊椎動物由来の感受性細胞が挙げられる。その中で、ヒト、マウス等の哺乳動物由来の感受性細胞が好ましく、例えば、ヒトの筋肉腫由来の株化細胞 MJ-841 (NCACC 85061801)、ヒト単球性白血病由来の株化細胞 THP-1 (IFO 50054)、ヒト鼻咽癌由来の株化細胞 KB (ATCC CCL17)、ヒト乳癌由来の株化細胞 BT-20 (ATCC ATB19) 及び MCF-7 (ATCC HTB22)、ヒト子宮癌由来の株化細胞 ME-180 (ATCC ATB33) 及びマウスの線維芽肉腫由来の株化細胞 L-M (ATCC CCL1.2) が挙げられる。更にこれらの細胞の変異株や細胞より単細胞クローン化したサブライン (Subline) が挙げられるがこれに限定されるものではない。又、外科的手

術により抽出された癌組織もまた本発明の受容タンパク取得のための原料として用いることができる。

上記の細胞の中で株化細胞は、通常は牛胎児血清を含有する人工栄養培地中で組織培養されるが、血清を含まない無血清人工栄養培地中に於ても組織培養することが可能であり、更にヌードマウスや幼若ハムスターの腹腔内、皮下に於ても十分増殖が可能である。例えば、ヒトの筋肉種由来の株化細胞である上記MJ-841は、20%FBS(牛胎児血清)、 $25\mu\text{g}/\text{ml}$ のタイロシンを含有する人工栄養培地であるDM160AU培地(板東製薬製)で培養できる。

本発明における生理活性物質受容タンパクは、生理活性物質に感受性のある細胞の膜面分を、該生理活性物質を担体に固定させて得られる親和性吸着体を用いるアフィニティークロマトグラフィーを含む精製処理に付すことにより単離することができる。精製処理にはアフィニティークロマトグラフィーの他にイオン交換、ゲル濾過、電気泳

動などを適宜組合せることができる。その具体的方法としては、例えば次の方法を挙げることができる。

(以下余白)

1. 生理活性物質感受性細胞を細胞洗浄液(例えば、ホウ酸、塩化ナトリウム、塩化マグネシウムおよび塩化カルシウム含有水溶液)で洗浄する。その後、抽出液(例えば、ホウ酸及びEDTA(エチレンジアミン四酢酸塩)含有溶液)に懸濁後、凍結と融解をくり返し、さらに超音波処理で細胞を破壊する。

2. ガーゼ濾過等及び低速遠心分離により細胞塊を除去する。

3. 高速遠心分離で細胞質面分を除去する。

4. ショ糖密度勾配遠心分離で膜面分を得た後、超高速遠心によりペレット状で膜面分を回収する。

5. 上記で得られる膜面分をニューオクチル- β -D-グリコシド等の透析容易な界面活性剤含有緩衝液に溶解したものをゲル濾過に付す。溶離液としては0.15M NaClを含む界面活性剤含有緩衝液が用いられ、そのpHは通常6.0~8.0である。ゲル濾過用担体の具体例としては、セファデックスG-150、セファデックスG-200、セファクリルS-200(以上ファルマシア社製)

、バイオゲルP-150、バイオゲルP-200(バイオラッド社製)、トヨパールHW-55、トヨパールHW-65(以上東洋ソーダ株式会社製)等が挙げられる。

6. 上記で得られる溶出面分をホローファイバ-膜あるいは平膜等で5~100倍程度に濃縮する。

7. 後述の参考例7のようにして作製した生理活性物質を担体に固定してなるアフィニティークラムに上記1~6の工程を経て得られた溶出液を供給後、界面活性剤含有緩衝液で洗浄する。その後、該生理活性物質含有緩衝液で溶出する。用いられる担体の具体例としては、セファロース4B、セファロース6B、セファロースCL-4B、セファロースCL-6B(以上ファルマシア社製)、バイオゲルA-5m、バイオゲルA-15m、アフィゲル(以上バイオラッド社製)などのアガロース系担体セファデックスG-100、セファデックスG-150、セファデックスG-200(以上ファルマシア社製)などのデキストラン系

担体、バイオゲルP-300、バイオゲルP-200（以上バイオラッド社製）などのポリアクリルアミド系担体、セルロファインGC-200、セルロファインGC-700（以上生化学工業社製）などのセルロース系担体が挙げられる。

8. 上記で得られる溶出液をゲル通過に付す。溶離液としては3M NaClを含む界面活性剤含有緩衝液が用いられ、そのpHは通常6.0~8.0である。ゲル通過用担体の具体例としては、セファデックスG-150、セファデックスG-200、セファクリルS-200（以上ファルマシア社製）、バイオゲルP-150、バイオゲルP-200（バイオラッド社製）、トヨパールHW-55、トヨパールHW-65（以上東洋ソーダ株式会社製）等が挙げられる。

9. 得られる溶出液を後述の実施例で示す方法において濃縮及び脱塩を行い、単離受容タンパクを得る。

本発明の生理活性物質受容タンパクは、広範な種類の癌細胞に共通した新しい癌特異抗原として

の性質を有するものであり、該受容タンパクを特異的に認識する抗体を用いた新しい癌の診断治療法の開発のための抗体取得用抗原として応用できるものである。また、上記の単離精製された生理活性物質受容タンパク以外に、生理活性物質受容タンパクを含有する生理活性物質感受性細胞及び該感受性細胞の膜面分、あるいは遺伝子工学的手法を用いて製造された受容タンパク又はその抗原決定基なども抗体取得用抗原として用いることができる。本発明の受容タンパクに対する抗体としては、上記抗原を山羊、羊、ウサギ、モルモット、ラットおよびマウス等の動物に、フロイントの完全アジュバントなどとともに投与することにより得られる抗血清ならびにハイブリドーマを用いる従来の取得法により得られるモノクローナル抗体を挙げることができる。

又、本発明の受容タンパクに対する抗体としては、上記の方法で得られるものの他に、本発明の受容タンパクを特異的に認識する、TNFに対する活性消去型のモノクローナル抗体に対する抗イ

デオタイプ抗体も挙げられる。この抗イデオタイプ抗体は、TNFの活性を消去する活性消去型のモノクローナル抗体を抗原として山羊、羊、ウサギ、モルモット、ラットおよびマウス等の動物に投与して抗血清を得、得られた抗血清をTNFの活性を消去しない活性非消去型の抗体で処理をして抗イデオタイプ抗体以外の抗体を吸収除去することにより得ることができる。得られた抗体を放射性同位元素で標識して、体内に投与し癌の診断に用いることができる。又、抗体に制癌剤を結合させてミサイル療法にも用いることも可能である。又、抗体そのものを、癌細胞を特異的に認識し破壊する制癌剤として癌の治療に用いることができる。更に又、血液中の癌細胞に特異的な抗原の検出に用いて癌の診断及び制癌剤の治療効果のモニタリングのために用いることもできる。更にまた、本発明の生理活性物質の受容タンパクは、MDP（ムラミルジペプチド）などの免疫増強物質で混和して用いることにより、特異的に受容タンパクに対する免疫能を誘発させる癌ワクチンの材料と

しても有用である。

（以下余白）

以下に参考例および実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

なお、参考例において、組換えDNAの作製、組換え体の微生物への導入は、特に断らない限り下記の実験書(1)~(4)に従って実施する。

- (1) 高木康敬編著 遺伝子操作マニュアル、講談社
- (2) 高木康敬編著 遺伝子操作実験法、講談社
- (3) ティー・マニアティス(T. Maniatis), イー・エフ・フリッツュ(E. F. Fritsch), ジェイ・サンプブルック(J. Sambrook), モレキュラークローニング(Molecular Cloning), コールドスプリングハーバーラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)刊(1982年米国)
- (4) レイ・ワー(Ray Wu)ら、メソッドインエンザイモロジー(Method in Enzymology) 101巻 アカデミックプレス(Academic Press)(米国)刊

クエン酸ナトリウム、pH7

5×SSC : 0.75M塩化ナトリウム + 0.075M

クエン酸ナトリウム、pH7

6×SSC : 0.90M塩化ナトリウム + 0.090M

クエン酸ナトリウム、pH7

FDSS : 50%脱イオン化ホルムアミド +
5×Denhardt's + 5×SSPE + 0.1%SDS
+ 100 μg/ml変性ウシ胸腺DNA

SSPE : 0.18M塩化ナトリウム + 10mMリン
酸二水素ナトリウム + 1mM EDTA, pH
7.4

SM : 1ℓ中に塩化ナトリウム5.8g、硫酸
マグネシウム・7水和物2g、1M
Tris・Cl(pH7.5)50mℓと2%
ゼラチン5mℓを含むフージ保存培
地

NZブロス : 1ℓ中にNZアミン(カゼインのタイプ
A水解物、フムコ・シエフィールド・
ケミカル・ディビジョン・オブ・クラ
フト社、米国)10g、塩化ナトリウ

参考例および実施例中で用いられる略号

MOPS : モリフォリノプロパンスルホン酸

LB培地 : ルリアーベルタニ培地

DMSO : ジメチルスルフォキシド

PFU : プラーク・フォーミング単位

EDTA : エチレンジアミン四酢酸

SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

BRL : ベセスダ・リサーチ・ラボラトリー社、
米国

DHF : ジメチルホルムアミド

Lac : ラクトース

Tris : トリス(ヒドロキシメチル)アミノメ
タン

XAR-5 : X線フィルム(イーストマン・コダッ
ク社、米国)

1×SSC : 0.15M塩化ナトリウム + 0.015M
クエン酸ナトリウム、pH7

2×SSC : 0.30M塩化ナトリウム + 0.030M
クエン酸ナトリウム、pH7

3×SSC : 0.45M塩化ナトリウム + 0.045M

45gと硫酸マグネシウム・7水和物2
gを含む培地

IPTG : イソプロピルチオガラクトシド

X-gal : 5-ブロモ-4-クロロ-3-インド
リルガラクトシド

TAE : 0.04M Tris-酢酸(pH8.0)-
0.002M EDTA

5×デンハルト溶液 : 1ℓ中にフィコール(Ficoll)
1000mg, ポリビニルピロリドン
1000mg, 及びウシ血清アルブミ
ン

1000mgを含む水溶液

bp : 塩基対

参考例1 L細胞障害活性評価

以下の参考例2及び3においてL細胞を用いる活
性評価は、Ruff等(Lymphokines 2巻 E. Pick
編集, Academic Press 235頁(1980))
あるいは[J. Immunol. 126巻1279頁(1
981年)]の方法に準じ、本発明において用い
られる生理活性物質がL929細胞(ATCC

CCCL1)を殺す効果を測定するものである。すなわち、順次増地で希釈した試料0.1mlと、 10^5 個/mlの濃度のL細胞の増地懸液0.1mlを、96穴の組織培養用マイクロプレート(フロー・ラボラトリー社、米国)に加える。増地は1v/v%のウシ胎児血清及び最終濃度5 μ g/mlのアクチノマイシンDを含むイーグルのミニマム・エッセンシャル増地(その組成は、たとえば、「組織培養」中井準之助他編集、朝倉書店、1967年に記載されている)を用いる。マイクロプレートを5%の炭酸ガスを含む空气中、37℃で21時間培養する。培養終了後、20%グルタルアルデヒド水溶液20 μ lを加え、細胞を固定する。固定後、マイクロプレートを洗浄、乾燥して、0.05%メチレンブルー溶液を0.1ml加え、生き残った細胞を染色する。余分なメチレンブルーを洗い流し乾燥した後、残ったメチレンブルーを0.36N塩酸溶液で抽出し、その665nmにおける吸光度をタイターテック・マルチスキャン(フロー・ラボラトリー社、米国)で測定

する。この吸光度は、生き残った細胞数に比例する。L929細胞の50%を殺すために必要な生理活性量を1単位/mlと定義し、試料を加えない対照の吸光度の50%の値に相当する試料の希釈率を、グラフあるいは計算によって求め、その希釈率の逆数を試料の生理活性量(単位/mlで表記する)とする。参考例において用いる“1単位”は、 10^5 個/mlのL929細胞の50%を殺すウサギTNFの量を意味する。

なお、参考例4~6におけるL細胞障害活性の測定法は、上記の方法と次の点で異なる。すなわちL929細胞のかわりにL-M細胞を用いること、増地に10v/v%のウシ胎児血清を含むイーグルのミニマム・エッセンシャル増地を用いること、増地時間を21時間のかわりに48時間とすることが異なる。

一方、蛋白質量は、ブラッドフォード(Bradford)らの方法[アナリ・バイオケム(Anal.Biochem.)72巻248~254頁(1976年)]により、クーマシー・ブリリアント・ブルーG 250を

用いる色素結合法から算出する。

参考例2

工程1(ウサギ血清TNFの取得)

雄ウサギ(体重2.5~3.0kg)にホルマリンにて死菌処理したプロピオニバクテリウム・アクネス(*Propionibacterium acnes*)〔コリネバクテリウム・パーバム(*Corynebacterium parvum*)、ウエルカム社、英国〕50mgを耳静脈より注射する。該ウサギに8日後再度100 μ gのエンドトキシン〔大腸菌026:B6由来のリボポリサッカライド、デイフコ社製、米国〕を耳静脈より注射し、2時間後に心臓より全採血する。採取した血液に100ml当たり100単位のヘパリンナトリウムを加えた後、5,000rpmで30分間冷却遠心操作を行ない、血球および不溶固型物を除去する。40羽のウサギより、血清TNF 3×10^4 単位/mlの活性を有する血漿2.4mlが得られる。

工程2(血清TNFの部分精製)

工程1で得た血漿2.4mlにセライト24gを加え、1時間攪拌した後濾過する。濾液に1.2ml

の0.04Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.8)を加えた後、0.1M塩化ナトリウムを含む0.04Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.8)で十分に平衡化したDEAEセファロースCL-6B(ファルマシア社、スウェーデン)のカラムに添加する。0.04Mトリス-塩酸緩衝液で洗浄後、0.18M塩化ナトリウムを含む0.04Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.2)を用いて溶出する。L細胞障害活性を示す画分を、限外濾過により濃縮する。次いで5mMリン酸緩衝液で平衡化したセファクリルS-200(ファルマシア社、スウェーデン)のカラムに該濃縮液を添加し、同緩衝液にてゲル濾過を行なう。活性画分は限外濾過により濃縮し 3.5×10^4 単位を回収する。比活性は 1.8×10^4 単位/mgである。

工程3(抗TNF抗体)

血清より得たTNFを工程2の如く部分精製しフロイントの完全アジュバントを1:1で混合し12週令の雄BALB/cマウスの背部皮下に注射する。2週後、及び4週後にこの操作を繰返し、

更に1週後に全採血し、その血清を取得する。

この血清をL細胞障害活性を測定する培地中に終濃度500倍希釈となるように添加し、ウサギ血清から得たTNFのL細胞障害活性を参考例1に示す方法で測定すると、L細胞障害活性は認められない。ここに得られるマウス血清は、ウサギ血清TNFに対する抗体(抗TNF抗体と称する)を含むものと結論できる。

工程4 (TNF産生細胞取得)

雌ウサギにホルマリンにて死菌処理したプロピオニバクテリウム・アクネス(*Propionibacterium acnes*) [コリネバクテリウム・パーバム (*Corynebacterium parvum*)、ウエルカム社、英国]を静脈内投与し、7日後に気管切開し、肺を生理食塩水で洗浄することにより浮遊性細胞を得る。この細胞を生理食塩水で洗浄後、10%ウシ胎児血清(フロー・ラボラトリー社、米国)を含むRPMI 1640(フロー・ラボラトリー社、米国)を培地とし、炭酸ガス5%含有空気を雰囲気とする炭酸ガスインキュベーターにて、37℃で培養する。

⑧) (ニュー・イングランド・ヌクレアー社、米国)により処理し、乾燥後、X線フィルム(フジRX、富士写真フィルム)に密着露光せしめる。エンドトキシン存在下に培養した培養上清に、分子量約17500の物質の生成が認められる。

また工程4における細胞培養の上清を上記と同様にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動に付した後、2.5%NP40[®](カルビオケム社、米国)で1時間、水中で2時間振とう後、各泳動レーンを切断分離し、泳動方向に直角に2mm巾にスライスする。各スライス断片をL細胞と共に培養することにより、L細胞障害活性を調べる。エンドトキシン存在下に培養上清を展開したレーンの分子量約17500の位置にL細胞障害活性が認められ、その他の位置には細胞障害活性は認められない。

工程6 (mRNAの抽出)

工程4と同様な細胞培養においてエンドトキシンを添加後2時間培養したのち、遠心分離にて細胞(ウサギ肺洗浄細胞)を集める。細胞質RNA

培養液を2コに分け、一方には大腸菌由来のエンドトキシン(大腸菌026:B6由来のリポポリサッカライド、ディフコ社、米国)を10μg/mlとなるように添加し、一方には同量の滅菌水を添加する。エンドトキシンを添加した培養上清にL細胞障害活性が出現し7時間で最高値に達する。この活性は抗TNF抗体で消去されるが、正常マウス血清では消去されない。

一方、エンドトキシンを添加しない細胞培養上清にはL細胞障害活性は認められない。

工程5 (TNFの分子量)

工程4における細胞培養においてエンドトキシンと共に放射性L-(³⁵S)メチオニン(1300Ci/mmol、アマージャム社、英国)を1μCi/mlとなるように添加して培養を行う。培養上清をレムリの方法[Laemmli, U. R. (1970年) Nature (London) 227巻680~685頁]に従ってSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析する。ゲル濃度は12.5%となるように調製する。泳動後エンハンス(ENHANCE

およびその中からのmRNAの抽出は下記の如くチャージン(Chirgwin)らの条件(Chirgwin, J. N. et al., Biochemistry 18巻5294頁(1979年))に従って行なう。細胞3×10⁶個に対して4mlの4Mグアニジンチオシアネート溶液を加え、ホモジナイザー(AM-7、日本精機製作所)にて破砕する。残渣を遠心除去後、2.4gの塩化セシウムを溶解し、あらかじめ2.5mlの5.7M塩化セシウム、0.1M EDTA溶液(pH7.5)を入れてあるポリアロマーチューブへ静かに重層する。

ベックマンSW41ローター(ベックマン社、米国)を用いて20℃30000rpmにて12時間、超遠心分離を行った後、上清を除き、ペレットを10mMトリス-塩酸緩衝液(5mM EDTA, 1v/v% SDSを含有する)1mlにて溶解する。この溶液を1mlのクロロホルムと1-ブタノールの混液(容積比4:1)で抽出し、水層に0.05容積の2M酢酸ナトリウムと、2.5容積のエタノールを加え、-20℃で2時間以上放置してR

NAを沈澱させる。遠心にて沈澱を集め、乾燥させたのち滅菌水500 μ lに溶解して、細胞質RNA溶液を得る。

上記細胞質RNA溶液を68℃、2分間加熱後急冷し、500 μ lの2倍濃度の10mMトリスEDTA緩衝液pH7.4(1mM EDTA, 0.1v/v% SDS及び0.5M塩化リチウムを含む)を加え、200 μ gのオリゴ(dT)-セルロース(BRL社、米国)カラムに展開、1倍濃度の上記バッファー10mMで洗浄、溶出緩衝液(10mMトリス-塩酸pH7.4, 1mM EDTA, 0.1v/v% SDSを含む)2mlで溶出する。溶出液に0.05容積の酢酸ナトリウム、2.5容積のエタノールを加えて-20℃に冷却して沈澱せしめる。沈澱を遠心にて集め、再度同様にオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着する画分を集める。紫外吸収スペクトル分析により、85 μ gのmRNAを回収する。

(以下余白)

た分画mRNAを1 μ g/ μ lになるように滅菌水に溶解し、卵母細胞1個あたり、50 μ lずつを微量注入し、1mg/mlのウシ血清アルブミンを含有するBarth溶液(7.5mMトリス-塩酸pH7.6, 88mM塩化ナトリウム、1mM塩化カリ、0.33mM硝酸カルシウム、0.41mM塩化カルシウム、0.82mM硫酸マグネシウム、2.4mM重炭酸ナトリウム、18U/mlペニシリンG、18 μ g/mlストレプトマイシンを含有する)中で24時間培養する。培養液のまま卵母細胞をガラス棒でつぶし、遠心後、上清のL細胞障害活性を測定する。沈降定数16S付近において、L細胞障害活性が最高値を与える。またこの活性は工程6で得た抗TNF抗体により消去されるが正常マウス血清では消去されない。

工程9 (形質転換体の取得)

工程7で得た分画mRNA 5 μ gを用い、実験書(1)96頁以降に従って二重鎖DNAを調製する。逆転写酵素はライフサイエンス社(米国)のものを使用する。二重鎖DNAを3.5%ゲル

工程7 (mRNAのサイズ分画)

工程6と同様にして得られるmRNA 880 μ gを250 μ lの水に溶解し、5-25%直線ショ糖密度勾配10mMに重層する。ショ糖密度勾配は、5および25%のショ糖を各々含むトリス緩衝液(25mMトリス塩酸pH7.2, 2mM EDTA, 1v/v% SDSを含有する)を用い、ISCO570グラジエンター(イスコ社、米国)により作製する。

ベックマンSW41ローターを用い、4℃40000rpm、12時間の超遠心を行ったのち分画回収装置(ベックマン社、米国)により各400 μ lの分画を回収する。各分画はエタノール沈澱し、遠心後滅菌水に溶解する。

工程8 (mRNAの型別実験)

アフリカツメガエル卵母細胞によるmRNAの型別は、実験書(例えば寺岡宏、五木幹男、田中兼太郎、蛋白質、核酸、酵素、臨時増刊、遺伝子操作、602頁1981年)に依る。アフリカツメガエルは、浜松生物教材より得る。工程7で得

濃度のポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分画し、長さ約1000~2000bpの画分330ngを得る。この画分7ngを用い同様の実験書に従い、ターミナルデオキシスクレオチジルトランスフェラーゼ(BRL社、米国)を用いてデオキシC鎖をつなぎ、同様にPst I部位にデオキシG鎖をつないだプラスミドpBR322 56ngとアニールせしめる。アニール後の混合物を用いて大腸菌K-12株(HB101, ATCC 33684)を形質転換し、2000株の形質転換体を得る。

工程10 (ウサギTNFの部分アミノ酸配列)

工程2で部分精製するTNFを、工程5にかけると同様にSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製する。一部をクマシー・ブリリアント・ブルー染色し、分子量約17000の位置に対応するバンドをゲルから切出し、1%重炭酸アンモニウムにより抽出する。5 \times 10⁷単位のTNFを使用し、蛋白として約180 μ g回収する。

このうち150 μ gを1%重炭酸アンモニウム75 μ lに溶解、TPCKトリプシン(ワシントン・

工程6に従って得たTNF産生細胞のmRNAを1Mグリオキザール、50容量%ジメチルスルホキシド及び10 mM NaH₂PO₄の存在下に50℃60分間処理したのち、1.1重量%アガロースゲル電気泳動により分画する。分画後のmRNAを、電気泳動式トランスファープロテイング装置(バイオラッド社、米国)を用いて、メーカーのマニュアルに従い、移動せしめる。次いで、この膜上のmRNAと、5×SSC及び150 µg/mlの変性サケ精子DNAを含む5×デンハルト溶液で65℃、2時間処理したのち、放射性標識したオリゴDNAを1×10⁷cpm/ml、5×SSC溶液を含む5×デンハルト溶液で50℃、2時間処理する。次いでこの膜を6×SSCで室温、40℃、50℃、60℃で順次洗浄し、X線フィルムXAR-5(イーストマン・コダック社、米国)に対し露光せしめる。この結果、mRNAと最も強くハイブリダイズするオリゴDNAはMJであって、MJ混合物中にmRNAと完全に相補的な配列を有するオリゴDNAが含まれているこ

とが判明する。

工程12 (ウサギTNF遺伝子のクローニング)

工程9で得られる形質転換体を実験書(2)162頁の方法に従ってセルロースフィルター上に移し、そのDNAと、工程11で選択される放射性標識オリゴDNA(MJ)とを工程11と同様の条件でハイブリダイズせしめる(コロニー・ハイブリダイゼーション)。強くハイブリダイズする株49個を選び更にフィルター上に固定して再度コロニー・ハイブリダイゼーションを実施し、標識オリゴDNA(プローブMJ)により強くハイブリダイズする9個を選ぶ。

この9個の株から、実験書(1)の6頁の迅速プラスミド分離法に従って各々約5 µgのプラスミドを取得する。このプラスミドを制限酵素Pst I、Iag I、Rsa I、Pvu II(いずれもBRL社、米国)を用い、メーカーのマニュアルに従って切断し、1重量%アガロースゲル電気泳動で、各々の酵素による切断片の長さを比較する。

この結果、9株すべてが、約50 bpのPvu II

とRsa Iによる断片を有し、9株のほとんどがRsa Iによる約200 bpの断片を有し、部分的に共通の配列を有することが示唆される。第8図に制限酵素による解析結果を図示する。

また、このうち7株を10 µg/mlのテトラサイクリンを含む2 mlのLB培地中で吸光度が第2表に示す値になるまで培養し、遠心にて集めた菌体を2 mlの生理食塩水中で超音波により破碎し、遠心上清のL細胞障害活性を測定すると、第2表に示す如く、L細胞障害活性を示す。対照実験としてプラスミドpBR322を含有する株を用いて同様の操作を繰返して行なう。結果を第2表に示す。

(以下余白)

第2表

プラスミド	インサートの塩基数	OD ₆₀₀	L細胞障害活性 単位/ml
pB2-2	1400	1.369	35
pB2-3	800	1.605	<10
pB2-7	1060	1.364	<10
pR 8	1550	1.618	<10
pR12	1400	1.458	15
pR18	1850	1.438	<10
pR25	1350	1.514	<10
pBR322	0	1.677	<10

またこの活性は抗TNF抗体により消去され、正常マウス血清では消去されない。従ってこの9株すべてがTNF遺伝子を含むプラスミドを有していることが示される。

工程13 (ウサギTNF遺伝子の塩基配列の決定)

プラスミドpB2-7、およびpR18を含有する大腸菌株を、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンを含有するM9培地〔実験書(3)440頁〕18中で培養した後、実験書(3)90頁の方法に従ってプラスミドを単離し、各々約 $150\mu\text{g}$ を得る。

各々の塩基配列をマキサム-ギルバート(Maxam-Gilbert)法〔マキサム等(Maxam et al.), メソッドインエンザイモロジー(Method in Enzymology), 55巻, 490頁, 1980年, アカデミックプレス(Academic Press)〕に従って決定する。また、この塩基配列と工程10で決定された部分アミノ酸配列の一致により、ウサギTNF蛋白の全構造が解明される。

工程14

プラスミドpR12の組換え体を用いて大腸菌内でlacをプロモーターとしてTNFを発現させることを目的にプラスミドの構築を行なう。第9図に示す様に $10\mu\text{g}$ のプラスミドpR12を10ユニットのApa I〔ビーアールエル(BRL)社〕で 37°C で2時間消化し、4%のポリアクリルアミ

ドゲル電気泳動で約630bpの断片を単離する。約 $1\mu\text{g}$ の断片がゲルから電気泳動溶出する。工程11と同様の方法によって第2図に示す2個デオキシオリゴヌクレオチド即ち、5'-GATCCATGT CAGCTTCTCGGGCC-3'と5'-CGAGAAGCTGACATG-3'とを合成し、実験書(3)122頁に従って約100psolの各デオキシオリゴヌクレオチドの5'末端をT.ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化する。反応終了後、反応混合物をフェノールを用いて抽出し、さらにクロロホルムを用いて抽出した後、オリゴマーを $0.5\mu\text{g}$ の約630塩基対のApa I断片と合せてエタノール沈澱させる。実験書(1)37頁に従って10ユニットのT. DNAリガーゼで前記の断片を 4°C で1夜反応させ結合する。反応終了液をエタノール沈澱後、20ユニットのBam HIで 37°C 3時間消化し、4%のポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、約670bpの断片を電気泳動溶出により回収する。市販のプラスミドpUC-8〔P-Lバイオケミカル社、カタログ番号4916、米国〕 $1\mu\text{g}$ をBam HIで消化してフェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈澱をして調製したベクター $0.5\mu\text{g}$ に約670bpのTNFの構造遺伝子を含む両端にBam HIサイトを持った断片をT. DNAリガーゼを用いて結合する。実験書(4)、20頁に従って、大腸菌JM103株を形質転換して 1mM IPTG及び 0.004% (v/v) x-galを含む寒天培地で培養して約200個の白色コロニーを得る。これらの形質転換体100個からプラスミドDNAを調製し、Bam HIで消化したところ、15個が目的の約670bpのBam HI断片を含んでいる。さらに、挿入の方向を調べるために、上記15個のプラスミドをpUC-8上に1ヶ所しか認識部位がないEco RIとPvu II (約670bpの断片上に認識部位がある)を用いて消化し、6重量%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて調べることににより、7個のプラスミドから目的の約140bpの断片が確認され、pUC-8上のlacプロモーターから順方向であることが判明する。

塩基配列の解析により、この7個のプラスミド

は同一で、lacプロモーター、合成DNA及びcDNA間の結合部に所望のヌクレオチド配列を有することが確認される。

プラスミドpR17を用いて、大腸菌内でlac UV5をプロモーターとしてTNFを直接発現させることを目的にプラスミドの構築を行なう。第10図に示す様に $10\mu\text{g}$ のプラスミドpR17を10ユニットのApa I〔ビーアールエル(BRL)社〕で 37°C 2時間消化し、4%のポリアクリルアミドゲル電気泳動で約630bpの断片を単離する。約 $1\mu\text{g}$ の断片がゲルから電気泳動溶出する。工程11と同様の方法によって第3図の2個のデオキシオリゴヌクレオチド即ち、5'-AAATTCATGT CAGCTTCTCGGGCC-3'と5'-CGAGAAGCTGACATG-3'とを合成し、実験書(3)122頁に従って約100psolの上記2種のデオキシオリゴヌクレオチドの5'末端をT.ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化する。反応終了液をフェノールを用いて抽出し、さらにクロロホルム抽出した後、先に得たpR17のApa I消化断片(約630

b p) 0.5 μ gと合わせてエタノール沈殿する。実験書(1)37頁に従って10ユニットのT.リガーゼで4℃一夜反応させ、結合せしめる。反応後、反応液をエタノール沈殿し、20ユニットのEcoRIで37℃3時間消化し、4%のポリアクリルアミドゲル電気泳動により約670bpの断片を回収する。

プラスミドpOP95-15は、フラーの方法(F. Fuller), ジーン(Gene), 19巻, 42頁~54頁, 1982年)に従って調製する。

pOP95-15の1 μ gをEcoRIで消化してフェノール抽出、クロロフォルム抽出、エタノール沈殿をしてベクターを調製する。ベクター0.5 μ gは、上記の如く合成デオキシオリゴヌクレオチドと、TNFをコードするDNAを結合して得られる約670bpの断片に、T.DNAリガーゼを用いて結合される。実験書(4)、20頁に従って、大腸菌JM101(ATCC 33876)を形質転換して1mIPTG及び0.004% (v/v)x-galを含む

寒天培地上に約150個の白色コロニーを得る。

これらのコロニー100個からプラスミドDNAを調製し、EcoRIで消化したところ12個が、目的の約670bpのEcoRI断片を有している。さらに挿入の方向を調べるために上記12個のプラスミドをPvuIIとPstIを用いて消化し、1.5重量%アガロースゲル電気泳動を用いて調べると4個のプラスミドから目的の約1280bp及び2600bpの断片が確認され、lacUV5プロモーターから順方向にTNF遺伝子が接続されていることが判明する。

塩基配列の解析により、この4個のプラスミドは同一で、lacUV5プロモーター、合成デオキシオリゴヌクレオチド、及びcDNAが正しく結合されていることが確認される。得られるプラスミドをpTNF-lacUV5-1と命名する。

(以下余白)

工程15 (大腸菌が産生するTNFの精製)

工程14で得られたプラスミドを含有する大腸菌株を100 μ g/mlのアンプシリンを含有するLB培地に50ml中37℃で1夜培養し、5mlの同上の培地に移して更に3時間培養する。インプロビル β -D-チオガラクトピラノシド(シグマ社、米国)を終濃度1mMになる様に添加し更に、6時間培養を続けたのち冷却し、遠心分離により菌株を集める。工程14におけると同様に菌体を0.04Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.8)5ml中で超音波破砕し、菌体蛋白溶液を得る。この溶液は 5×10^7 単位/mlのL細胞障害活性を示す。

この溶液を工程2と同様に精製し 1.2×10^7 単位のTNFを得る。このものの比活性は 6.8×10^7 単位/ μ gである。

工程16 (メスエイザルコーマ(Meth A sarcoma) 組織マウスを用いる活性評価)

BALB/cマウスの腹部皮内に 2×10^5 個のメスエイザルコーマ(Meth A sarcoma)細胞を移植

する。7日後、移植した腫瘍の大きさが直径7~8mmとなり、出血性壊死などがなく良好な血行状態にあるマウスを選び、尾静脈より生理食塩水で希釈した0.5mlの工程15で得られるTNF試料を注射し、24時間後に次の判定基準により判定を行なう。

(-) : 変化なし

(+) : かすかな出血性壊死

(++) : 中程度の出血性壊死(移植癌表面の真中から50%以上にわたって壊死)

(+++): 顕著な出血性壊死(移植癌の中央部が重度に壊死し、周囲の癌組織がわずかに残った状態)

また、試料投与後20日目に癌が完全に退縮したかどうかを観察し完治率を求める。

以上の方法により測定し、大腸菌の産生するTNFの活性を第3表に示す。

$$\text{完治率} = \frac{\text{完全に癌が退縮したマウス数}}{\text{実験マウス数}}$$

第3表

大腸菌の 生産するTNF 単位/匹	匹数	壊死の程度(1日目)				完治率 20日目
		-	+	++	+++	
2×10 ⁸ 対 照	5	0	0	1	4	5/5
生理食塩水	5	5	0	0	0	0/5

参考例3

工程1 (プラスミドpR18、pB2-7、pB2-2の大腸菌 K12, MC1061株への形質転換)

参考例2で得られる上記3種のプラスミドを常法に従って大腸菌 K12 MC1061株へ形質転換する。詳しくは大腸菌 K12 MC1061株のコロニーをLB培地を用いて、550nmの吸光度が0.3になるまで培養する。該培養物50mlを集め、25mlの10mM RbClを含む10mM MOPS (pH7.0) 溶液で洗浄し、次いで50mM CaCl₂、10mM RbClを含む0.1M MOPS (pH6.5) に再び懸濁する。

該懸濁液を30分間氷冷し、遠心後、上清を除去し、30μlのDMSOおよび50mM CaCl₂と10mM RbClを含む0.1M MOPS (pH6.5)の混合液中に懸濁させる。該懸濁液を200μlずつ

を精製する。【実験書(3)、88-96頁】

すなわち、LB培地に、それぞれの形質転換体を植菌し、激しく振とうしながら37℃で培養する。

次いで、この工程をくりかえして形質転換体を増殖させ、更にプラスミドを増幅させる。次に、得られる形質転換体の培養液を4℃に冷却しながら、4000gで10分間遠心を行ない、上清を除去する。

氷冷STE (0.1M塩化ナトリウム、10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.8) と1mM EDTA) の100mlを用いて洗浄し、続いて10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) の中に20mg/mlのリゾチームを含む水溶液を用いて細胞を煮沸溶菌する。得られる粘性液体を遠心チューブに移し入れ25,000rpm30分間4℃で遠心を行なってDNA溶液を得る。

該DNA溶液の容量を測った後、該溶液1ml当りに、固体の塩化セシウム1gを加え、塩化セシウムが完全に溶けるまで、ゆっくりと注意深く

分注し、前述のプラスミドDNA溶液10μlをそれぞれに加える。

該混合液をそれぞれ30分間氷冷した後、44℃で60秒ヒートショックを与え、ただちに、あらかじめ37℃に温めておいた5mlのLB培地を加える。この溶液を37℃で1時間培養した後、それぞれの溶液を遠心し、上清を除去し、細胞ペレットを得る。該細胞ペレットにLB培地を加え、攪拌した後、懸濁液とする。該懸濁液を30μg/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天プレートにまき、37℃で1夜培養を行なう。その結果、プラスミドpR18、pB2-7とpB2-2からそれぞれテトラサイクリン耐性形質転換菌のコロニーが得られる。

工程2 (pB2-7とpR18プラスミドDNAの調製)

工程1で得られるプラスミドpB2-7とpR18の形質転換体を下記の報文の方法に従って培養し、プラスミドを増幅させる。次いで得られる形質転換体を集菌し、破砕したのち、プラスミドDNA

を精製する。該塩化セシウム水溶液の10ml毎に、10mg/mlのエチジウムブロマイド水溶液0.8mlを加える。この結果、該溶液の最終比重は1.55g/ml、エチジウムブロマイドの最終濃度は約600μg/mlとなる。

該塩化セシウム水溶液を適当な遠心チューブに移し、空隙に軽パラフィンオイルを加え、20℃で36時間、45,000rpmの遠心続けると上層に環状の微生物由来DNAとニックの入った環状プラスミドDNAと、下層に開環状プラスミドDNAがくる。下部のDNAのバンドをチューブの横に注射針をさしこんで採取しガラスチューブに移す。エチジウムブロマイドを除去し、水層をTAE緩衝液に透析する。プラスミドDNA溶液をRNase処理し、等量の飽和フェノール溶液で抽出する。水層をあらかじめ0.1% SDSを含むTAE緩衝液 (pH8.0) で平衡化したバイオゲル (BioGel) A-150に付す。DNAを洗い込み、活性画分を取得する為に0.1% SDSを含むTAE緩衝液で抽出する。分画液をエタノール

で沈殿させ、精製したプラスミドDNAを得る。

上記の方法により、精製pB2-7プラスミドDNAが250 μ g、pB18プラスミドDNAが134 μ g得られる。

工程3(精製pB2-7とpR18プラスミドDNAのニクトランスレーション)

工程2で得られる精製プラスミドDNA40 μ gを制限酵素 PstI で消化分解し、次いで4%アクリルアミドゲル電気泳動にかける。

電気泳動後、染色を行ない目的とするバンドを切出してPstIインサートを単離する。500ngの該PstIインサートを用いて、ティ・マニアティス(T. Maniatis)らの方法(プロシーディングズオブザナショナルアカデミーオブサイエンスオブザユナイテッドステイツオブアメリカ(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 72, 1184(1974))に従ってニクトランスレーションを行なった。ニクトランスレーションは市販キット【ビーアールエル(BRL)社】を用いる。

工程2で得られる精製pR18を用いて、同様に上記の方法に従ってニクトランスレーションを行なう。比活性は 7×10^7 cps/ μ g DNAである。

工程4(pR18プラスミドDNAのRsaI断片取得)

80 μ gのpR18プラスミドDNAを制限酵素 RsaI で消化し、4%アクリルアミドゲル電気泳動に付す。下記の目的とするインサートのバンドを切出しBNDカラムを用いて精製する。

約640bp 3.77 μ g (回収率52%)

約175bp 1.77 μ g (回収率50%)

この約640bpのインサートをpR18の3'断片(pR18の3'側の翻訳されない部分を意味する)、約175bpのインサートをpR18-cfr(pR18のコード部分)と命名する。

更に上記に於いてRsaIの代わりにPstIとHstIIを用いて消化して、約450bpの断片3.65 μ g(回収率60%)を得る。このインサートはpR18の5'断片と命名する。

25 μ lの反応系中で放射化したdCTPを80pmole用いる(400Ci/pmoleの場合)。

まず下記混合溶液を調製する。

2.5 μ l 溶液A(dNTP溶液)

2.5 μ l 溶液B(500ngのDNA、すなわちPstIインサート)

5 μ l 放射性dCTP
(3200Ci/pmole)

1.3 μ l dCTP (65pmole, 50pmole/ μ l dCTP)

11.2 μ l 溶液E(H₂O)

計22.5 μ l

この22.5 μ lの溶液に、2.5 μ lの溶液C(DNase I, DNAポリメラーゼI)を加え、

15℃60分反応させる。

次いで、溶液D(停止緩衝液)を加え、停止させる。更に、キャリアー tRNAを加えエタノール沈澱を2回行ない、次いで500 μ lの水に溶解する。

比活性は、 9.3×10^7 cps/ μ g DNAである。

工程5(ヒト染色体TNF遺伝子の単離)

参考例3の工程3で得られる³²Pラベル化プラスミドpB2-7インサートをハイブリダイズ用プローブとして用い、シャロン 4AのEcoRI切断サイト【ブラットナー(Blattner)らの方法、サイエンス(Science), 196, 161(1977)]にヒトDNAを部分消化しサイズ分画した断片【マニアティス等(Maniatis et al.), セル(Cell) 15, 687(1978)]を組み込んで作成したバクテリオファージ シャロン 4A/ヒト染色体遺伝子ライブラリーの10⁶個のブラークをスクリーニングする。その方法として【ベントン及びデビス(Benton and Davis), サイエンス(Science), 196, 180(1977)]を用いる。

出発培養液中のバクテリオファージの総てが、該生理活性物質を作成する為に必要な遺伝子材料を含んでいるとは限らないので、ウサギTNFの遺伝子に相補的な配列を持つプローブを用いる。

目的とする遺伝子を含むファージブラークは、放射活性を有するプローブとハイブリダイズし、

その放射能活性により見つけることができる。このようにして9つのハイブリダイズブランクが、該ライブラリーから得られる。

方法と条件は次の通りである。

- 1) ブランク数: $\sim 1 \times 10^8$ ブランク ($\sim 4 \times 10^8$ ブランク / $\phi 150$ mm プレート $\times 25$)
 - 2) ニトロセルロースフィルターへの転写:
(ベントン及びダビス(Benton and Davis), サイエンス(Science), 196, 180 (1977) 参照)
 - 3) ハイブリダイズ: 1.25×10 cps / ml の参考例3工程3で得たpB2-7インサートプローブの添加、42℃、19.5時間
 - 4) 洗い: $2 \times \text{SSC} - 0.1\% \text{SDS}$ を用いて室温で10分間洗いを4回、続いて $1 \times \text{SSC} - 0.1\% \text{SDS}$ を用いて50℃で30分間洗いを2回
 - 5) 露光: XAR-5、-80℃、2枚の増感紙、39時間
- 上記スクリーニングで12の候補株が得られる。

のブランクの代わりに用いる。

ウサギ染色体遺伝子を含む2つのバクテリオファージ(RG-1、RG-2)が得られる。

(以下余白)

上述と同様の方法で二次スクリーニングを行ない所望の断片を有する9個の株を得る。これらの株を用いて上述と同様の方法で三次スクリーニングを行ない所望の断片を有する8個の株を得る。この9個の株について上述と同様の方法で4次スクリーニングを行ない、9個の株が所望の断片を含むことを確認する。所望の断片を含む8個のバクテリオファージを、それぞれHG1~HG8と命名する。

工程6 (ウサギ染色体TNF遺伝子の単離)

消化ヒトDNAの代りに消化ウサギDNA

(マニアティス等(Maniatis et al), セル(Cell), 15, 687(1978))を用いて調製した 10^8 個のバクテリオファージ シャロン4A / ウサギ染色体遺伝子ライブラリーのブランクを用いる以外は参考例3工程5と実質的に同様の操作を行なう。 6.7×10^8 個のバクテリオファージ シャロン4A / ウサギ染色体遺伝子ライブラリーのブランクを 10^8 個のバクテリオファージ シャロン4A / ヒト染色体遺伝子ライブラリー

工程7 (ヒト遺伝子クローンのサザンブロット解析)

参考例3工程5で得られたHG-3、HG-6、HG-7のバクテリオファージを用いて、それぞれDNAを次の方法に従って得る。

6×10^{10} 個の大腸菌LE392(宿主)を18 mlのSM中に懸濁し、そこにバクテリオファージHG-3の 3×10^8 PFUを加え、37℃で20分間感染させる。次いで得られる混合液を3 mlのNZブロスに加え、37℃、23時間攪拌培養する。次いで60 mlのクロロホルムを該混合液に加えて30分間攪拌する。最終濃度1Mとなるように混合液中に更に塩化ナトリウムを加えた後15分間放置する。次いで遠心操作を行なって上清を得る。次いで得られる上清に分子量約60000のポリエチレングリコールをポリエチレングリコールの濃度が10% (w/v) になるように加えて、4℃、22時間放置する。次いでバクテリオファージを遠心操作を行なって採取する。得られるバクテリオファージをSMの28 mlに

懸濁し、次いでクロロホルムを等量加える。ボルテックスミキサーで30秒間混合した後、遠心して水層を集め、その全量をSMで30mlにする。これに26.4gの塩化セシウムを加え、静かに溶解した後、超遠心(45000rpm, 20時間)でファージのバンドを採取する。10mM塩化ナトリウムと10mM塩化マグネシウムを含む50mMトリス緩衝液(pH8.0)に透析した後、それぞれの最終濃度が20mM、50μg/ml、0.5%となるようにEDTA、プロテイナーゼK、SDSを加え65℃で1時間処理する。次にフェノール、フェノール:クロロホルム=1:1(容積比)、クロロホルムで各1回ずつ抽出し、得られる水層を1mMEDTAを含む10mMトリス緩衝液(pH8.0)で透析する。この溶液の紫外線吸光度を測定すると、バクテリオファージHG-3の純粋なDNAが得られることが確認される。バクテリオファージHG-3のDNAを調製するために用いられる方法と実質的に同じ方法を応用することにより、バクテリオファージHG-6とHG-7

のDNAを得る。

このようにしてHG-3、HG-6、HG-7のDNAを各々2920μg、1100μg、819μgを得る。次いでサザン(Southern)法[イー・エム・サザン、ジェイ・モル・バイオル(E. M. Southern, J. Mol. Biol.), 98, 503 (1975)]に従って、以下の実験条件でこれらのDNAのサザンブロッティングを行なう。

1) DNA:

HG-3	825ng
HG-6	935ng
HG-7	685ng

2) 各種制限酵素による分解:

BamHI	10単位、EcoRI	10単位、
BamHI	10単位+EcoRI	10単位、
HindIII	10単位、	
HindIII	10単位+EcoRI	10単位、
PvuII	10単位	
37℃	3時間	

3) 電気泳動:

XAR-5 (イーストマン・コダック社、米国) - 80℃、2枚の増感紙

14時間ハイブリダイズの結果は、第4表に示す。

(以下余白)

0.8%アガロースゲル

TAE

28V、15.5時間

4) ニトロセルロースフィルターへの転写:

[イー・エム・サザン、ジェイ・モル・バイオル(E. M. Southern, J. Mol. Biol.), 98, 503 (1975) 参照]

5) プレハイブリダイズ:

30ml FDSS

42℃ 6時間

6) ハイブリダイズ:

pR18の5'-断片(1×10⁶cpm/ml、

参考例3工程4にて調製したもの)を含む

42℃、14時間

7) 洗い:

2×SSC-0.1%SDSを用いて室温で

10分間洗いを4回、続いて1×SSC-

0.1%SDSを用いて50℃で30分間洗

いを2回

8) 露光:

第4表

酵素	クローン(バクテリオファージ)	プローブ(pR18)とハイブリダイズする断片の大きさ	
		5' 末端	3' 末端
<u>Bam</u> HI	HG-3	6.7kb	←
	-6	11.2kb	←
	-7	9.2kb	←
<u>Bam</u> HI + <u>Eco</u> RI	HG-3	2.9kb	←
	-6	"	←
	-7	"	←
<u>Eco</u> RI	HG-3	"	←
	-6	"	←
	-7	"	←
<u>Hind</u> III + <u>Eco</u> RI	HG-3	"	←
	-6	"	←
	-7	"	←
<u>Hind</u> III	HG-3	9.7kb	←
	-6	4.1kb	←
	-7	9.7kb	←
<u>Pvu</u> II	HG-3	2.2kb	0.9kb
	-6	1.9kb	0.9kb
	-7	2.2kb	0.9kb

←は左と同じ断片がハイブリダイズしたことを示す。

動する。2.9 kbのバンドをアガロースゲルより、ティ・マニアティス(T. Maniatis)〔モレキュラー クローニング、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory), 377(1982)〕の方法で単離する。詳しくは、2.9 kbのバンド部位を切り出したゲルを65℃で15分間加熱する。さらに、この2.9 kbの長さを持つEcoRI 分解HG-3断片(以降、これを「HG-3/EcoRI 2.9 kb断片」と略することが多い)を、溶けたゲルよりフェノールで3回、エタノールで3回抽出、酢酸アンモニウムを含むエタノールで沈澱して回収する。このようにして、637 µg(収率約30%)のHG-3/EcoRI 2.9 kb断片を得る。

上記断片255 ngとEcoRI 分解pUC13(ジェイ・メッシング, メソッズ イン エンザイモロジー(J. Messing, Methods in Enzymology), 101, 20(1983))を、2.5単位のT. リガーゼを用いて結合する。

大腸菌K12 JM83株を上で得られる結合

工程8 (ウサギ遺伝子クローンのサザンブロット解析)

参考例3工程7において、HG-3、HG-6、HG-7のかわりにRG-1、RG-2のバクテリオファージのそれぞれを用いる以外は、実質的に同様の操作によってサザンブロット解析を行なう。その結果、pR18の5'断片はRG-1およびRG-2をBamHI、EcoRI、BglII、HindIIIおよびBamHI + EcoRIのそれぞれで分解して得られる断片の、単一バンドにハイブリダイズすることがわかる。

工程9 (ヒト染色体のTNF遺伝子を含むバクテリアクローンの構築)

工程5において得られたHG-3のDNAを、ランディ(Landy)らの方法〔バイオケミストリー(Biochemistry), 13, p. 2134(1974)〕によって得る。このHG-3のDNA33 µgをEcoRIの80単位によって37℃で3時間分解する。分解物は1%低融点アガロースゲル(条件: 1×TAE, 20V, 14.5時間)にて電気泳

生成物を用いて形質転換する。詳しくは、大腸菌K12 JM83株をLB培地中で、培養ブrossの550 nmにおける吸光度が0.3になるまで培養する。50 mlの増殖した大腸菌K12 JM83株を集め、25 mlの10 mM MOPS(pH7.0) - 10 mM RbClで洗い、25 mlの0.1 M MOPS(pH6.5) - 50 mM CaCl₂ - 10 mM RbCl中に懸濁する。この懸濁液203 µlに、10 ngの上記結合生成物を含む10 µlの水溶液を加える。この混合物を氷中にて30分間冷却し、42℃で60秒間加熱する。その後すぐに、あらかじめ37℃にしておいたLBブross5 mlに、加熱した混合物を加え、37℃で1時間培養する。得られる培養ブrossを遠心し上清を除去する。遠沈した細胞にLB培地を加えて、30 µg/mlのアmpiシリンと40 µg/mlのx-galを含むLBプレートに植菌する。インサートを含むプラスミドが導入された大腸菌K12 JM83株のコロニーは白色であるが、プラスミドのみが導入された株のコロニーは青色である。得

られる白色コロニーは再び、 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンと $40\mu\text{g}/\text{mL}$ のx-galを含むLBプレートに確認のため植菌する。

上で得られる白色コロニーより、10個のコロニー(バクテリアクローン)を選び、ホルメス(Holmes)とクイグレイ(Quigley)の迅速法(アナール・バイオケム(Anal. Biochem.), 114, p.193 (1981))を用いてスクリーニングする。

詳しくは、それぞれのコロニーを $30\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含むLB培地で一晚培養する。増殖した細胞を集め、 $2\text{mg}/\text{mL}$ リゾチーム- 50mM グルコース- 10mM EDTA- 25mM トリス(Tris)-HCl (pH8.0)中に懸濁する。この懸濁液を室温で5分間おき、これに $200\mu\text{L}$ の 0.2N NaOH- 1% SDSを加える。ゆっくり攪拌したのち、この懸濁液を2分間室温におく。続いて、 $150\mu\text{L}$ の 3M 酢酸ナトリウム(pH5.2)を加え、10分間- 20°C におき、15分間遠心してその上清を得る。この上清に $900\mu\text{L}$ の冷エタノールを加え、5分間遠心してその沈澱

を得る。得られる沈澱を 70% エタノールで洗い乾燥してプラスミドDNAを得る。この方法を用いて10個のプラスミドを得る。

それぞれのプラスミドDNAを、 10mM トリス(Tris)- 0.1mM EDTA (pH8.0)に溶かし、EcoRIで消化し、制限酵素消化のために電気泳動に供する。消化と電気泳動の条件は以下の通りである。

消化：プラスミドDNA溶液=上で得られたものの5分の1量、3単位のEcoRI、 37°C 、1.5時間

電気泳動： 1% アガロースゲル、 $1\times\text{TAE}$ 、 120V 、2時間

上記の制限酵素解析によって、10種のクローンのうち8種が目的のものであることが示される。すなわち、この8種のクローンは 2.9kb の断片を持っている。8種の目的クローンのうち、1つを選び大腸菌K12JM83 (pHGE)株(ATCC39656)と名づける。

続いて、pB2-7とpR18を有する大腸菌

のかわりに大腸菌K12のJM83 (pHGE)株を用いる以外は工程2と同じ操作によって、 $1.89\mu\text{g}$ のpHGE DNAを得る。

工程10 (EcoRI 分解RG-1のサブクローニング)

工程6において得られる $30\mu\text{g}$ のRG-1をEcoRIにより消化する。得られる各種断片の混合物より、上記各種断片の混合物と 0.8% の低融点アガロースゲルを用いる以外は工程9と実質的に同じ操作によって、約 3.5kb の長さを持つ断片を回収し、 $1.0\mu\text{g}$ のEcoRI分解RG-1断片(3.5kb)を得る。この断片とEcoRIで消化したpUC13を、EcoRI 分解HG-3断片(2.9kb)のかわりに上記EcoRI 分解断片(3.5kb)を用いる以外は工程9と実質的に同じ操作によって、連結する。

大腸菌K12 JM83株への形質転換、バクテリアクローンのスクリーニング、クローンDNAの分解と電気泳動は、上記結合DNA断片を用いる以外は上記工程9と実質的に同じ操作によって行なう。得られるクローンは大腸菌K12JM

83 (pRGE)株(ATCC39655)と名づける。

続いて、大腸菌K12JM83 (pRGE)株をpB2-7とpR-18のかわりに用いる以外は工程2と実質的に同じ操作によって、pRGE DNAを $1.70\mu\text{g}$ 調製する。

工程11 (pHGE プラスミドDNAの制限酵素解析)

工程9で得られるpHGE DNAの制限酵素解析を、マニアティス(Maniatis)の方法[モレキユラー クローニング, コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory), 98頁 (1982)]によって行なう。

その方法と条件は以下の通りである。

- 1) EcoRI によるpHGE DNAの分解： $18.6\mu\text{g}$ のpHGE、64単位のEcoRI、 37°C 2時間
- 2) エタノール沈殿：沈殿物
- 3) 溶解：EcoRI 分解pHGEが $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の

溶液になるように蒸留水を加える。

- 4) 各種制限酵素による消化: 1 μ gの上記EcoRI分断pHGE。
制限酵素: 5単位のPvuII、5単位のPvuII + 10単位のRsaI、10単位のRsaI、4単位のKstII、3単位AvaI、9単位のPstI、37℃、2時間
- 5) 電気泳動: 2%アガロースゲル、1×TAE 28V、14.5時間
- 6) ニトロセルロースフィルターへの転写: (イー・エム・サザン、ジェイ・モル・バイオル(E. M. Southern, J. Mol. Biol.), 98, p. 503 (1975) 参照)
- 7) 第一回プレハイブリダイズ: 30mM FDS S、42℃、6時間
- 8) 第一回ハイブリダイズ: pR18の5'断片 (工程4で得られるもの、5×10⁴cpm/ml) 42℃、14時間
- 9) 洗い: 2×SSC-0.1%SDSを用いて室温で10分間洗いを4回、続いて1×SSC

- 19) 第3回プレハイブリダイズ: 7)と同じ操作
- 20) 第3回ハイブリダイズ: pR18の3'断片 (工程4で得られるもの、4.5×10⁴cpm/ml)、42℃、15時間
- 21) 洗い: 9)と同じ操作
- 22) 露光: 10)と同じ操作

制限酵素地図解析の結果を第11図に示す。

工程12 (pRGEプラスミドDNAの制限酵素解析)

pHGEプラスミドDNAのかわりにpRGEプラスミドDNAを用いる以外は工程11と実質的に同じ方法により工程10で得られるpRGEプラスミドDNAの制限酵素解析を行なう。得られるpRGE DNAインサートの制限酵素地図を第12図に示す。

工程13 (ウサギTNF遺伝子とヒトTNF遺伝子の塩基配列の決定)

工程9で得られる大腸菌K12JM83 (pHGE) 株と工程10で得られる大腸菌K12JM83 (pRGE) 株をpB2-7を有する大腸菌

-0.1%SDSを用いて50℃で30分間洗いを2回

- 10) 露光: XAR-5 (イーストマン・コダック社、米国)、-80℃、2枚の増感紙、17.5時間
- 11) 洗い: 0.5M NaOH-1.5M NaClで1分間、0.5M トリス(Tris)-1.5M NaClで1分間、3×SSCで1分間
- 12) 露光: 露光時間を19時間とする以外は、上記10)と同じ操作
- 13) 第2回プレハイブリダイズ: 7)と同じ操作
- 14) 第2回ハイブリダイズ: pB2-7インサート (工程3で得られるもの)、42℃、16.5時間
- 15) 洗い: 9)と同じ操作
- 16) 露光: 露光時間を19.5時間とした以外は、上記10)と同じ操作
- 17) 洗い: 11)と同じ操作
- 18) 露光: 露光時間を20時間とした以外は、上記10)と同じ操作

K12MC1061株とpR18を有する大腸菌K12MC1061株の代わりに用いる以外は前記工程2と実質的に同じ操作を行なう。そして、それぞれ150 μ gのpRGEプラスミドDNAとpHGEプラスミドDNAを得る。

pRGEとpHGEの塩基配列はマキシムーギルバート(Maxam-Gilbert)法(マキシム等(Maxam et al.), メソッズ イン エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 55巻490頁(1980年)アカデミック プレス(Academic Press))によって決定する。

参考例2で決定したpR-18の塩基配列と、上で決定したpRGEの塩基配列を比較して、ウサギTNF遺伝子の構造(エクソンとイントロンを含む)を解明する。pRGE DNAインサートの構造は第12図に示す。続いて、pRGEとpHGEの塩基配列を比較して、類似性とイントロン・エクソン境界付近の相同配列を調べる。このようにしてヒトTNF遺伝子の構造(エクソンとイントロンを含む)を解明する。ヒトTNF遺伝

子の構造を第11図に示す。

このようにして得られるウサギTNFとヒトTNFをコードする塩基配列を下に示す。この塩基配列において、上の行はウサギTNFをコードする塩基配列(R)を、下の行はヒトTNFをコードする塩基配列(H)を示す。

(以下余白)

```

R TCA GCT TCT CGG GCC CTG AGT GAC AAG CCT
H TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT

R CTA GCC CAC GTA GTA GCA AAC CCG CAA GTG
H GTA GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT

R GAG GGC CAG CTC CAG TGG CTG AGC CAG CGT
H GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG

R GCG AAC GCC CTG CTG CGC AAC GGC ATG AAG CTC
H GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG

R ACG GAC AAC CAG CTG GTG GTG CCG GCC GAC
H AGA GAT AAC CAG CTG GTG GTG CCA TCA GAG

R GGG CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTT CTC
H GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC

R TTC AGC GGT CAA GGC TGC CGC TCC ... TAC
H TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT

R GTG CTC CTC ACT CAC ACT GTC AGC CGC TTC
H GTG CTC CTC ACC CAC ACC ATC AGC CGC ATC

R GCC GTC TCC TAC CCG AAC AAG GTC AAC CTC
H GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC

R CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAC CGG
H CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG

R GAG ACC CCC GAG GAG GCT GAG CCC ATG GCC
H GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC AAG CCC

```

```

R TGG TAC GAG CCC ATC TAC CTG GGC GGC GTC
H TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC

```

```

R TTC CAG TTG GAG AAG GGT GAC CGG CTC AGC
H TTC CAG CTG GAG AAG GGT GAC CGA CTC AGC

```

```

R ACC GAG GTC AAC CAG CCT GAG TAC CTG GAC
H GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC

```

```

R CTT GCC GAG TCC GGG CAG GTC TAC TTT GGG
H TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG

```

```

R ATC ATT GCC CTG
H ATC ATT GCC CTG

```

注) 記号“...”は、ウサギTNFをコードす

るDNAの塩基配列中にこの部分は存在しないことを意味し、従ってこの記号の両端に隣接する2つのコドンは直接つながっている。

工程14 (オリゴデオキシヌクレオチドの合成)

コハク酸残基を介して2.0 μMのデオキシヌクレオチドが結合しているポリスチレン樹脂20 mgを、上下にステンレススチール製のフィルターをついた500 μl容量の反応容器に装填する。樹脂は1 μM臭化亜鉛ジクロロメタン-イソプロパノール溶液(85:15)で処理してジメトキシトリテル(DMT)保護基を除き、ジクロルメ

タン-イソプロパノール(85:15)、次いでジメチルフオルムアミド、ピリジン、更にアセトニトリルで洗浄し、窒素気流で乾燥する。次いでDMT-ヌクレオチド(20 μM)および、メシチレンスルフォニルニトロトリアゾール(60 μM)の乾燥ピリジン溶液200 μlを加える。45℃で20分間反応せしめた後、反応液を除去し、乾燥ピリジンで樹脂を洗浄後、ピリジン中の無水酢酸で未反応の残基を保護する。この、脱保護及び結合のサイクルを繰り返して、所望のオリゴデオキシヌクレオチドが樹脂上に合成される。次に樹脂をとり出し、オリゴヌクレオチドを樹脂から分離して、精製を行う。上記のオリゴデオキシヌクレオチドの合成および精製は伊東ら〔ヌク・レス(Nuc.Ac. Res.), 10巻、1755頁(1982)]の方法に従って実施する。このようにして下記の如きオリゴデオキシヌクレオチドが得られる。

- 1) 5'-AATTTCATGTCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAA-3'
- 2) 3'-GTACAGTAGAAGAGCITGGGGCTCACTGTTCGG-5'

3) 5'-GCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAAACCTCAAGC-3'

4) 3'-ACATCGGGTACAACATCGTTTGGGAGITCGACT-5'

工程15 (ヒトTNFのミニ遺伝子を含むM13mp9-HGEの調製)

プラスミドpHGE (10 µg) をEcoRI (20単位) で消化し、1%の低融点アガロースゲル電気泳動の後、2.9 kbのフラグメントを切出し精出す。このフラグメントはM13mp9ファージの複製型のEcoRIフラグメント中へ挿入する。EcoRIフラグメントを挿入されたDNAはBRL社の手引書(ユーザーマニュアル(User Manual)/M13mp7クローニング(Cloning)/'ディデオキシ'('Dideoxy')シーケンシング(Sequencing), 1980)に従い、大腸菌JM103を形質転換する。生成物をM13mp9-HGEと命名する。

工程16 (M13mp9-HGE一重鎖DNAとデリターE3-4を用いるイントロン3の除去)

M13mp9-HGE一重鎖DNAはBRL社

卸し、更に氷水中で冷却する。各0.4 mMのdATP、dCTP、dGTP、dTTPおよびATP溶液に対し、クレノーフラグメント(Klenow fragment) 5単位、T₄リガーゼ10単位を含むHin緩衝液(ウォレス(Wallace)ら、ヌク・アクリス(Nuc.Ac.Res), 9巻3647頁(1981年)、即ち10 mMトリス-塩酸(pH7.2)、2 mM塩化マグネシウム及び1 mMβ-メルカプトエタノールを含む液、を加える。反応混合物(最終容量50 µl)は4℃で30分間及び室温で30分間、インキュベートする。オリゴヌクレオチドをプライマーとして二重鎖合成されたDNAはBRL社の手引書(ユーザーマニュアル(User Manual)/M13mp7クローニング(Cloning)/'ディデオキシ'('Dideoxy')シーケンシング(Sequencing), 1980)に従って、大腸菌JM103株に感染せしめる。このようにして得られるプラークは、YTプレート(ジェイ・エイチ・ミラー(J. H. Miller), エクスペリメンツ イン モレキュラージェネティクス(Experiments in Molecular Ge-

の手引書(ユーザーマニュアル(User Manual)/M13mp7クローニング(Cloning)/'ディデオキシ'('Dideoxy')シーケンシング(Sequencing), 1980)に従って調製される。

工程14で調製されたオリゴデオキシヌクレオチド4)3'-ACATCGGGTACAACATCGTTTGGGAGITCGACT-5'がイントロン3のデリターとして用いられる。イントロン3のデリターは"E3-4"と命名する。

デリターE3-4は、除去されるべきイントロン3の前方(即ちエクソン3)、及び後方(即ちエクソン4)に対し相補的な配列を有している。イントロン3の除去はウォレス(Wallace)らの方法[サイエンス(Science), 209巻1396頁(1980年)]に従い、次の如く行う。

E3-4 (164 ng、15 pmole)は、T₄キナーゼ(10単位)およびATP (3 mM)を用いてリン酸化され、燐型M13mp9-HGE (1.65 µg、0.5 pmole)に加えられる。反応混合物は65℃、10分間加熱し、5分間室温に冷

却し、コールドスプリングハーバーラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory) (1972年) 433頁)に移す。得られるコロニーは、³²Pで標識されたE3-4と55℃2時間の条件でハイブリダイズされる。イントロン除去工程の結果得られる各種生成物の内から、所望の配列を有するDNAを得るためのプローブとして、ここでは、デリターE3-4それ自身を利用する。かくしてデリターE3-4とハイブリダイズするコロニーを得、更にファージを取得する。

得られるファージをプレートにまき、得られるプラークをYTプレートに移す。ここで再び³²Pで放射ラベルしたE3-4と55℃2時間の条件でハイブリダイズせしめる。強くハイブリダイズするクローンから、ファージDNAを取得し、塩基配列を解析し、イントロン3が完全に除去されているファージを選別する。このようなファージの1つをmp9-HGEΔ3-1と命名する。

工程17 (pHTNF-2a cUV5-2の構築)

p 9-HGEΔ3-1の複製型をEcoRIで消化し、電気泳動により単離する。この断片をEcoRIで切断したpBR327に挿入し、プラスミドpHGEΔ3-1を得る。

次にプラスミドpHGEΔ3-1を用い、lacUV5をプロモーターとしてTNFを大腸菌中で、直接発現させることのできるプラスミドを構築する。この構築方法は第14図に示される。

まず10μgのプラスミドpHGEΔ3-1を10単位のAvaIとEcoRI(BRL社、米国)で37℃2時間消化し、4重量%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により目的フラグメントを単離する。約1μgの断片が電気泳動溶出によりゲルから回収される。工程14と同じように第14図に示される2種のオリゴデオキシヌクレオチド即ち5'-AATTCATGTCATCTCTCGAACC-3'及び5'-TCGGGTTTCGAGAAGATGACATG-3'を合成する。次いで文献(3)122頁の方法に従いこの2本のオリゴヌクレオチド(約100pgole)の5'端をT、ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化する。

これらの形質転換体からプラスミドDNAを調製し、EcoRIで消化し、目的のEcoRI断片を有するプラスミドを同定する。更にDNAの挿入の方向を調べるためにこれらのプラスミドをPvuIIとPstI消化して1.5重量%アガロースゲル電気泳動を行った結果約1280bp及び約2600bpの断片を有し、lacUV5プロモーターの下流に正しくTNFをコードするDNAが接続されているプラスミドを選別する。

塩基配列を決定すると、2個のプラスミドは同じ塩基配列を有し、合成オリゴヌクレオチド及び染色体由来のcDNAが正しく接続されていることが示される。得られるプラスミドをpHTNF-lacUV5-2と命名する。

pHTNF-lacUV5-2を含有する大腸菌を、通常の栄養培地で培養する。生成物のTNF活性を測定すると、lacプロモーターによって制御されるウサギTNF遺伝子を有するpTNF-lacUV5-1を含有する大腸菌の生産物とほとんど同様の活性を示す。

反応後、フェノールで次いでクロロホルムで抽出する。かくして得られる合成オリゴマーと、上記で得られるpHGEΔ3-1のAvaI-EcoRI断片0.5μgとを混合し、エタノール沈殿した後、文献(1)37頁の方法に従って10単位のT、リガーゼを用い4℃一夜で結合せしめる。反応終了後、混合物はエタノール沈殿し、4重量%ポリアクリルアミドゲル電気泳動により目的断片を単離する。

プラスミドpOP95-15はエフ・フラー(F. Fuller)の方法(ジーン(Gene)19巻、42-54頁(1982年))により調製する。

pOP95-15の1μgをEcoRIで消化してフェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿をして調製したベクター0.5μgと、上記の如く得た断片を、T、DNAリガーゼを用いて結合する。実験書(4)、20頁に従って、得られるベクターで大腸菌JM101株(ATCC33876)を形質転換して1mM IPTG及び0.004%(v/v) x-galを含む寒天培地上に約100個の白色コロニーを得る。

参考例4

参考例3における工程1から14に従って調製されるプラスミドpHGEとオリゴヌクレオチド1)-4)を用いて、pHTNF-lacUV5-1を調製する。その調製方法を第13図に示す。

参考例5

1) 抗原の精製

参考例4で得られる遺伝子組換え体pHTNF-lacUV5-1を含有する大腸菌を、通常の方法で培養する。次いで目的とする生理活性物質が生産されるよう1mM IPTGを加えて誘導操作を行ない、さらに培養を行なって該生理活性物質を含有する大腸菌を得る。遠心分離により菌体を集め、該菌体を0.04Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.8)1L中で超音波破砕し該生理活性物質を含む菌体抽出液を得る。

この溶液は、 4.5×10^5 U/mgの活性を示し、比活性は 3.0×10^5 U/mgであった。

次いで該抽出液を、0.04Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)で十分平衡化したDEAE-セファロース

CL-6B(ファルマシア社、スウェーデン)のカラムに添加する。0.04Mトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)で洗浄後、0.1M塩化ナトリウムを含む0.04Mトリス-塩酸緩衝液(pH 8.0)を用いて溶出する。活性成分を限外ろ過により濃縮して、比活性 $4.0 \times 10^5 \text{ U/mg}$ の粗精製溶液を得る。

この粗精製溶液を、0.15M塩化ナトリウムを含む5 mM リン酸緩衝液(pH 7.4)で平衡化したセファクリルS-200(ファルマシア社、スウェーデン)のカラムに添加し、同緩衝液にてゲルろ過をおこなう。活性成分を限外ろ過により濃縮して濃度 $2.0 \times 10^5 \text{ U/ml}$ 、比活性 $7.5 \times 10^5 \text{ U/mg}$ の精製溶液を得る。

2) マウスの免疫

上で得られた精製溶液と、フロイント・コンブライト・アジュバントを同量混合・乳化化させ、BALB/cマウスの雄の皮下に2週間の間隔をあけて3回にわけて1回当り0.2ml投与し、免疫を行なう。さらに4週間後、同マウスの腹腔内に該精製溶液0.5mlを投与し、最終免疫を行なう。

プテリン $4 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、チリジン $1.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ を含んだRPMI1640-10%FCS培地(HAT培地)を各ウェルに0.1mlずつ添加する。その後3~4日毎に半分量をHAT培地で交換すると、7日目からいくつかのウェルでハイブリドーマ細胞の生育が認められ、2~3週間後にはほぼ全ウェルでハイブリドーマ細胞が増殖する。

4) 抗体産生細胞の検索とクローニング

ハイブリドーマ細胞の生育してきたウェルの培養上清0.1mlを、該生理活性物質が固定されている96穴マイクロプレートのウェル内に入れて、室温で1時間静置する。0.1%のウシ血清アルブミンを含む生理食塩水で洗浄後、ペルオキシダーゼで標識された抗マウスIgG(カッセル社、米国)の10000倍希釈液を0.1ml/ウェル加え、室温で1時間静置する。0.1%ウシ血清アルブミンを含む生理食塩液で洗浄後、基質液(30mg o-フェニレンジアミン、7μl過酸化水素水、10ml 0.1Mクエン酸、10ml 0.2Mリン酸水素ナトリウム)を0.15ml/ウェル加える。

3) 細胞融合

最終免疫の3日後に同マウスを殺し、脾臓を取り出す。これを細断した後ステンレスメッシュで圧迫・濾過し、イーグルのミニマム・エッセンシャル培地(MEM)に浮遊させ、脾細胞浮遊液を得る。この脾細胞とマウスミエローマ細胞(P₃/X63-Ag8 UI)をそれぞれMEMで3回洗浄し、脾細胞とミエローマ細胞を4:1で混合して遠心(800rpm15分)する。得られる沈殿に44%ポリエチレングリコール2000/MEM溶液2mlを徐々に加え、37℃温水中で1分間遠心管をゆっくり回転させて細胞融合を行なう。次いでMEM1mlを加えてゆっくり回転させ、さらに毎分2mlの割合でMEMを添加し計10mlとした後遠心(600rpm,5分)する。沈殿を、10%ウシ胎児血清(FCS)含有ロズウェル・パーク・メモリアル・インスティテュート(RPMI)1640培地にミエローマ細胞として 7×10^5 個/mlになるように懸濁し、96穴マイクロプレートに1ウェルあたり0.1ml植えつける。

1日後、HAT(ヒポキサンチン $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、アミノ

30分後492nmの吸光度を測定し、抗体産生細胞の存在するウェルを検索する。

強い抗体活性を示すウェル中の各クローンを、ガラス細管を用いて吸い出してクローニングを行なう。各クローンにつき、上記の方法で抗体活性を再検索して、強い抗体活性を示すHybrid Cell Line HIV3Fのクローンを得る。

これらの細胞は、10%FCS含有RPMI-1640培地を用いて培養を拡大し、細胞を集め、15%FCS及び10%ジメチルスルホキシドを含有するRPMI-1640培地中で液体チン素内に貯蔵する。

5) ハイブリドーマ細胞の腹水化

上で得られるハイブリドーマ細胞 1×10^7 個を、あらかじめ0.2mlのプリスタン(2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン)を腹腔内に投与しておいたBALB/cマウスの腹腔内に接種することにより腹水化を行なう。10日後3~5ml/匹の腹水を採取する。

6) モノクローナル抗体の精製

上記腹水の10mlに硫酸アンモニウムを2.66

g 加え(35%飽和)、4℃で一晩攪拌する。生じる沈殿を遠心分離し、0.01Mリン酸緩衝液(pH8.0)で平衡化しておいたDEAE-セファロースCL-6B(ファルマシア社、スウェーデン)のカラムに添加し、同緩衝液で洗浄した後、0.2M NaClを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH8.0)で溶出する。ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりモノクローナル抗体面分を決定し、最終的にHIV3Fモノクローナル抗体148ngを得る。

7) モノクローナル抗体のサブクラス決定

オクタロニー免疫拡散法(その方法はたとえばハドソン(Hudson)ら著“プラクティカル イムノロジー(Practical Immunology)”, ブラックウェルサイエンティフィック パブリケーションズ(Blackwell Scientific Publications)(1976)107-115頁に記載してある)にて、抗マウスIgG₁、IgG₂、IgG_{2b}(いずれもマイルズ(Miles)社、米国)を用い、サブクラスを決定する。その結果HIV3Fモノクローナル抗体はIgG₁である。

8) モノクローナル抗体による該生理活性物質

社、スウェーデン)を用いて、アウデー(Audeh)らの方法[ネイチャー(Nature), 219(1980)66]に従って実施する。

その結果、HIV3Fモノクローナル抗体の等電点は、6.4~6.7である。

(以下余白)

の活性の消去

1)で得られる該生理活性物質の精製溶液を10%FCS含有MEM培地で200U/mlおよび2000U/mlに希釈した。6)で得られるモノクローナル抗体も同培地で各濃度に希釈する。両液を1ウェルあたり0.05mlずつ96穴マイクロプレートに加える。37℃で1時間置いて、10⁵個/mlのL-M細胞の同培地懸濁液を0.1ml加える。その後の操作は参考例1に記載したL細胞障害活性測定法に準ずる。同時に該生理活性物質もモノクローナル抗体も加えない実験(A)とモノクローナル抗体のみを加えない実験(B)も行なう。

その結果HIV3Fモノクローナル抗体はTNFの活性を消去しない活性非消滅型のモノクローナル抗体であることがわかる。

9) モノクローナル抗体の等電点測定

薄層ゲル等電点電気泳動装置(ファルマシア社、スウェーデン)を用い、該モノクローナル抗体の等電点を測定する。キャリアー・アンフォライトとしてファルマライトpH3~10(ファルマシア

参考例6 (ヒトTNFの¹²⁵I標識)

参考例3で得られるヒトTNF (5.87×10⁷U/25mg/ml)60μlと0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液(pH8.4)20μlを氷冷下に混合したものを、あらかじめ窒素気流下に溶媒を蒸発させたボルトン・ハンター試薬(アマーシヤム社、英国、4,000Ci/mmol)5μCiの入った容器に注入して、室温で2時間反応させ、1Mグリシンを10μl加えて反応を停止させる。この反応液を、あらかじめ5mMリン酸緩衝液(pH7.4)で平衡化したセファデックスG-25(ファルマシア社、スウェーデン)(8ml、直径1.0cm×高さ10cm)に添付して脱塩を行ない、¹²⁵I標識ヒトTNF面分1μlを得る。参考例1に記載の方法によるL細胞障害活性の測定および放射活性の測定により標識体の比活性を得る。得られる標識体の比活性は140Ci/mmolである。

参考例7 (ヒトTNF固定化セファロースの作製)

トレシル活性化セファロース4B (Tresyl act

ivated Sepharose 4B) (ファルマシア社製, スウェーデン) 5 g を 1 mM の HCl に懸濁させると約 20 ml に膨潤する。これをガラスフィルター上に移しアスピレーターで吸引しながら 1 mM HCl で十分に洗浄する。次に 0.1 M NaHCO_3 -0.5 M NaCl , pH 8.0 (カップリングバッファー) 200 ml で洗浄する。このゲルを 50 ml の遠心チューブに移し、2.5 mg/ml の TNF を含むカップリングバッファー 20 ml を加え、4℃ 16 時間、暖かに揺とうして反応させる。

反応終了後、この懸濁液をガラスフィルターで濾過し、さらに、20 ml のカップリングバッファーで洗浄した濾液を集める。集めた濾液は TNF 濃度が 0.3 mg/ml である。この濾液は約 2 倍に希釈されているので、遊離の TNF から計算したカップリング効率は 76% である。一方、ゲルを再び遠心チューブに移し、1 M エタノールアミン-塩酸 pH 9.0 に懸濁して 4℃ で 4 時間緩やかに揺とうして未反応の解離基を反応させる。その後、再びガラスフィルター上に移して、0.1 M NaHCO_3 - Na_2CO_3 , pH

8.5 50 ml 及び 0.1 M 酢酸バッファー pH 4.0 50 ml で交互に洗浄を 3 回繰り返した。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、pH を中性に戻して使用する。

参考例 8

(免疫染色法による L-M 細胞と L-R 細胞の受容タンパク量の定性的比較)

L-M 細胞 (ATCC CCL1.2) と L-R 細胞 (50 万 U TNF に耐性の L-M 細胞由来の細胞株) をそれぞれ 4×10^5 個/ml 含む細胞浮遊液 1 ml をあらかじめカバーガラスを入れた 12 穴のマルチディッシュ内のウェルに入れ、一晚培養し、L-M 細胞と L-R 細胞の標本を得る。尚、L-R 細胞は次のようにして得られる。まず L-M 細胞を最初は TNF 1 U 含む培地で 3 日間培養する。培養後生存する細胞を培地中の TNF 量を約 2 倍ずつ増やしながらか 3 日間隔で継代培養する。このようにして 50 万 U の TNF に耐性を有する L-R 細胞が得られる。L-R 細胞は 50 万 U TNF に耐性である以外は形状、性質等は L-M 細胞と変わらない細胞株である。得られた標本、参考例

3 で得られる生理活性物質 (ヒト TNF), 参考例 5 で得られる該生理活性物質に対する活性非消去型のモノクローナル抗体 H IV 3 F, および、オーソミューン染色用キット (オーソ・ダイアグノスティック・システムズ株式会社) 中の第一次抗体を除く試薬を用いて、オーソミューン染色用キットの手順に準じて該生理活性物質の受容タンパクの免疫染色を行なう。すなわち、上記細胞の標本をデシケーター中で充分乾燥し、アセトンで 10 分間固定し、室温で 5 分間乾燥した後、リン酸緩衝液に 10 分間浸す。次に非特異的反応をあらかじめ阻止するために上記染色用キットのブロッキング試薬 (正常ヤギ血清) で 20 分間処理した後、該生理活性物質 2×10^4 U/ml、200 μ l を滴下して室温で 20 分間処理する。更に、該生理活性物質に対する活性非消去型のマウスモノクローナル IgG 抗体 H IV 3 F (40% 塩安沈殿後、リン酸緩衝液で透析した部分精製品、約 8 mg タンパク質/ml) をキットの第一次抗体の代わりに用いて 20 分間反応させる。以下、キットの操作手引書の手順に

従う。すなわち、キットの第二次抗体 (ヤギ抗マウス免疫グロブリン) を 20 分間反応させ、次いでキットの標識抗体 (ペルオキシダーゼ標識マウス免疫グロブリン) を 20 分間反応させる。最後にキットの AEC 基質 (3-アミノ-9-エチルカルバゾール) を加えて 20 分間反応させて免疫染色工程を終了する。次に、キットの操作手引書の手順に従い、ヘマトキシリンによる対比染色を施した後、ゼラチンで封入して顕微鏡観察を行なう。尚、該生理活性物質のかわりに 0.1% ゼラチン含有リン酸緩衝液を用いる対照の染色標本をも作成し、非特異的な染色の程度を調べる。その結果を第 1 図に示す。L-M 細胞を該生理活性物質で処理したもの (第 1 図 (a)) は、対照 (第 1 図 (b)) に比して明らかに濃く染色される。これに対し L-R 細胞では該生理活性物質で処理したもの (第 1 図 (c)) と対照 (第 1 図 (d)) とで染色度に差は認められず、その染色度は L-M 細胞の対照と同程度である。これらの結果より、該生理活性物質に対する受容タンパクが L-M 細胞に多く存在し、

L-R細胞にはほとんど存在しないことがわかる。

またヒト胎児肺由来正常2倍体細胞(マイクロバイオリジカル アソシエーツ社, 米国)を用いる以外は上記と同様の方法で免疫染色を行なう。該ヒト胎児由来正常2倍体細胞にはL-R細胞と同様の生理活性物質に対する受容タンパクは認められない。

参考例9

(ヒトTNFによるL-M細胞受容タンパクの確認)

5×10^7 個のL-M細胞を細胞洗浄液(0.05Mホウ酸、0.15M塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム及び1mM塩化カルシウムからなる溶液を1M水酸化ナトリウムでpH 7.2に調整したもの)40mLに懸濁し、450g、5分間、4℃で遠心分離することにより洗浄した後、抽出溶液(0.02Mホウ酸、0.2mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸塩)からなる溶液を1M水酸化ナトリウムでpH 10.2に調整したもの)20mLに懸濁する。これを-20℃で凍結した後、37℃で融解すること(凍結融解)を3回繰り返し、更にウルトラソニック社(米国)のW-225R型

超音波破砕器で40-50ワットで1分間超音波処理する。これに0.5Mホウ酸水溶液160mLを加えてよく攪拌した後、2枚重ねのナイロンガーゼで伊通して大きな細胞塊を除去する。この伊液を2℃、450gで10分間遠心分離して得られる上清をさらに2℃で12,000g 30分間遠心分離する。その沈澱をリン酸緩衝液2.5mLに懸濁した後、35%シロ糖を含むリン酸緩衝液3mLの上に重層して、2℃で24,000g、1時間遠心分離する。その重層界面に濃縮される膜面分をリン酸緩衝液800μLに懸濁した後、100,000g、10分間2℃で超遠心する。得られる沈澱は約5μLである。これに10%トリトンX-100水溶液0.5μLを加え、室温に15分間放置した後リン酸化溶液(200mM ヘプス緩衝液(pH 7.4)、0.6M塩化ナトリウム、10%ウシ胎児血清、30mM塩化マンガンからなるもの)4μLを加える。これに参考例3で得られるヒトTNF(2×10^5 U/μL)または0.1%ゼラチンを含有するリン酸緩衝液を25μLを加え、さらに γ -³²P-アデノシントリリン酸(アマーシャム社製、 $>5,000$ Ci/μmol)

を10μCi加えた後、氷上で5分間反応させる。これをリン酸緩衝液500μLで2回洗浄(12,000g、2分間、室温で遠心分離)して、その沈澱にSDSサンプル溶液(1% SDSおよび40%シロ糖水溶液からなるもの)40μLを加えて、5分間煮沸した後、ポリアクリルアミド10%を含むSDS-ポリアクリルアミド平板ゲル電気泳動を行なう。ゲルを乾燥し、コダックX-Omat ARフィルム(イーストマン、コダック社、米国)を用いてオートラジオグラフィーを行なう。結果を第2図に示す。第2図において(a)はヒトTNFを添加しないものの結果を示し、(b)はヒトTNFを添加したものの結果を示す。第2図に示されるように分子量9.5万の位置にバンドが認められる。これより分子量9.5万の受容タンパクがヒトTNFによりリン酸化されることがわかる。

参考例10 (クロスリンク(Cross-link)法によるL-M細胞、MJ-841細胞由来受容タンパクの分子量測定)

1×10^6 個のL-M細胞とMJ-841細胞を

それぞれ細胞洗浄溶液(0.05Mホウ酸、0.15M塩化ナトリウム、1mM塩化マグネシウム、1mM塩化カルシウムからなる溶液を1M水酸化ナトリウムでpH 7.2に調整したもの)40mLに懸濁し、4℃、450gで5分間遠心分離することにより洗浄し、抽出溶液(0.02Mホウ酸、0.2mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸塩)からなる溶液を1M水酸化ナトリウムでpH 10.2に調整したもの)20mLに懸濁する。これを-20℃で凍結し、37℃で融解すること(凍結融解)を3回繰り返し、更にウルトラソニック社(米国)のW-225R型超音波破砕器で40~50ワットで1分間超音波処理する。これに0.5Mホウ酸水溶液160mLを加えてよく攪拌した後、2枚重ねのナイロンガーゼで伊通して大きな細胞塊を除去する。この伊液を2℃、450gで10分間遠心分離して得られる上清をさらに2℃で12,000g 30分間遠心分離する。その沈澱をリン酸緩衝液2.5mLに懸濁した後、35%シロ糖を含むリン酸緩衝液3mLの上に重層して、2℃で24,000g、1時間遠心分離する。その重層界

面に濃縮された膜面分をリン酸緩衝液 $800\mu\text{L}$ に懸濁し、 2°C 、 $100,000\text{g}$ で 10 分間超遠心する。得られる沈渣は L-M 細胞、 MJ-841 細胞ともに、約 $10\mu\text{L}$ である。これに 10% トリトン (Triton) X-100 水溶液 $1\mu\text{L}$ を加え、室温に 15 分間放置した後、参考例 6 で得られる ^{125}I 標識ヒト TNF ($140\text{Ci}/\mu\text{mol}$, $1.4\text{mCi}/\mu\text{L}$) を $50\mu\text{L}$ 加えて 4°C で 1 時間静置する。これに 0.1% ウシ胎児血清を含むリン酸緩衝液 $500\mu\text{L}$ を加えて、 $12,000\text{g}$ 、 2 分間、室温で遠心して洗浄する操作を 3 回行ない。沈渣に 1M ジサクシニミジルスルベート (DSS) 溶液 (DSS をジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解した 100mM 溶液をリン酸緩衝液で 100 倍に希釈したもの) $200\mu\text{L}$ を加えて、室温で 15 分間反応させる。これをリン酸緩衝液 $500\mu\text{L}$ で 2 回洗浄 ($12,500\text{g}$ 、 2 分間、室温で遠心分離) して、その沈渣に SDS サンプル溶液 (1% SDS および 40% シュウ糖水溶液からなるもの) $40\mu\text{L}$ を加えて、 5 分間煮沸した後、ポリアクリルアミド 10

$\%$ を含む SDS-ポリアクリルアミド平板ゲル電気泳動を行なう。ゲルを乾燥した後、コダック X-Omat AR フィルム (イーストマン・コダック社、米国) を用いてオートラジオグラフィーを行なう。 L-M 細胞についてその結果を第 3 図に示す。第 3 図より明らかなように分子量 3.5 万のヒト TNF のバンドの他にヒト TNF と受容タンパクが架橋された複合体のバンドが、分子量 13 万に認められる。この結果より該受容タンパクの分子量は 9.5 万であることが示唆され、参考例 2 の結果との一致から分子量 9.5 万が確認される。 MJ-841 細胞についても L-M 細胞と同様の結果が得られる。

参考例 11 ^{125}I 標識ヒト TNF を用いる バインディング アッセイ (Binding Assay)

L-M 細胞及び MJ-841 細胞 (NCACC 85061801) をそれぞれ 5×10^5 個を、 L-M 細胞は $10\text{v}/\text{v}\%$ のウシ胎児血清を含むイーグルのミニマム・エッセンシャル培地 (フロー・ラボラトリ社製、米国) 1mL 中に、 MJ-841 細胞は 20

$\text{v}/\text{v}\%$ のウシ胎児血清を含む DM-160AU 培地 (種東製薬 (株) 社製、日本) 1mL 中にそれぞれ懸濁して 4°C で 1 時間静置した後、細胞をバインディング用培地 (0.1% ウシ血清アルブミン含有イーグルのミニマム・エッセンシャル培地) で 3 回洗浄する。洗浄細胞にバインディング用培地 $400\mu\text{L}$ を加えた後、参考例 6 で得られた ^{125}I 標識ヒト TNF ($140\text{Ci}/\mu\text{mol}$) を含む 0.1% ゼラチン含有リン酸緩衝生理食塩水 $50\mu\text{L}$ およびバインディング用培地もしくは参考例 3 で得られた非標識ヒト TNF を含む 0.1% ゼラチン含有リン酸緩衝生理食塩水を $50\mu\text{L}$ 加えて更に 4°C で 1 時間静置する。これを 1% ウシ胎児血清含有イーグルのミニマム・エッセンシャル培地で 3 回洗浄した後、 0.5M の NaOH を $400\mu\text{L}$ 加えて 37°C で 30 分間放置することにより細胞を溶解させ、その中に含有される ^{125}I の放射汚性をヤーカウンターを用いて測定する。用いられる ^{125}I 標識体は最終濃度が 5nM 以下になるように濃度を変えて加え、非特異的バインディングを調べるために添加

した非標識体は最終濃度が $1\mu\text{M}$ になるように加える。培地に加えたヒト TNF の濃度と細胞に結合したヒト TNF の量との関係を第 4 図 (L-M 細胞) および第 6 図 (MJ-841 細胞) にグラフにして示す。これらの結果から特異的結合についてスキャッチャード・プロット (Scatchard plot) 解析 [スキャッチャード, ジー. (Scatchard, G.), アニュアル ニューヨーク アカデミー オブサイエンス (Annual New York Academy of Science) 51 巻 660~672 頁 1949 年] した結果を第 5 図 (L-M 細胞) および第 7 図 (MJ-841 細胞) にグラフにして示す。これらのグラフで表される勾配と切片から、 L-M 細胞の受容タンパク数は $4.06 \times 10^4/\text{cell}$ で、解離定数は $1.56 \times 10^{-10}\text{M}$ である。一方、 MJ-841 細胞の受容タンパク数は $6.20 \times 10^4/\text{cell}$ で、解離定数は $1.61 \times 10^{-10}\text{M}$ である。

(以下余白)

実施例 1

工程 1 (TNF の受容タンパクを含有する膜面分の抽出)

ディスポーサブルセルスクレイパー〔コスター (Costar[®]) (コスター社、米国)] を用いてシャーレからはがした L-M 細胞 3×10^8 個を細胞洗浄液 (0.05 M ホウ酸、0.15 M 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウムおよび 1 mM 塩化カルシウムからなる溶液を 1 M 水酸化ナトリウムで pH 7.2 に調整したもの) 40 ml に懸濁し 4℃ で、450 g、5 分間、遠心分離することにより洗浄した後、抽出溶液 (0.02 M ホウ酸、0.2 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸塩) からなる溶液を 1 M 水酸化ナトリウムで pH 10.2 に調整したもの) 20 ml に懸濁する。これを -20℃ で凍結し、37℃ で融解すること (凍結融解) を 3 回繰返し、更にウルトラソニック社 (米国) の W-225 R 型超音波破砕器で 40~50 ワット 1 分間超音波処理する。これに 0.5 M ホウ酸水溶液 160 ml を加えてよく攪拌し、

0 ml を分取する。これを通常の方法によりホローファイバー膜 (分子量カット 6000) で 40 ml にまで濃縮する。

工程 3 (アフィニティークロマトグラフィー)

工程 2 で得られるサンプルをあらかじめ上記緩衝液で平衡化した TNF 結合セファロース CL-6B カラム (TNF 3 mg/ml ゲル結合) (4 ml、直径 0.9 cm × 高さ 6.3 cm) に添加し、20 倍量の同緩衝液で洗浄した後、TNF 100 U/ml を同緩衝液で溶出し (溶出面分 6 ml)。

工程 4 (ゲル透過)

前記精製工程で得られる溶出液を、あらかじめ 3 M KCl、0.5% n-オクタール-β-D-グリコシドを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で平衡化したセファクリル S-200 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (160 ml、直径 1.5 cm × 高さ 90 cm) に添加した後、同緩衝液で溶出し、分子量 8 万から 11 万の面分 10 ml を分取する。次いでこの面分をセントリコン (アミコン社、米国、分子量 1 万カット) で濃縮

2 枚重ねのナイロンガーゼで濾過して大きな細胞塊を除く。この濾過を 2℃、450 g で 10 分間遠心分離して得られる上清をさらに 2℃ で、12,000 g 30 分間遠心分離する。その沈渣をリン酸緩衝液 2.5 ml に懸濁した後、35% ショ糖を含むリン酸緩衝液 3 ml の上に重層して、2℃ で 24,000 g、1 時間遠心分離する。その重層界面に濃縮される膜面分をリン酸緩衝液 800 μl に懸濁し、2℃ で 100,000 g、10 分間超遠心する。得られる沈渣は 60 μl である。

工程 2 (ゲル透過)

工程 1 で得られる膜面分 20 ml を 200 ml の 1% n-オクタール-β-D-グリコシドで可溶化したものを、あらかじめ 0.15 M 塩化ナトリウム、0.5% n-オクタール-β-D-グリコシドを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したセファクリル S-200 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (7000 ml、直径 10 cm × 高さ 90 cm) に添加した後、同緩衝液で溶出し、分子量 8 万から 11 万の面分 40

して 1 ml とし、これをあらかじめ 0.15 M NaCl、0.5% n-オクタール-β-D-グリコシドを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したセファデックス G-25 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (6.4 ml、直径 0.9 cm × 高さ 10 cm) に添加し、脱塩を行ない、1.5 ml の精製面分を得る。この精製面分の 200 μl に、0.1% ウシ胎児アルブミンを含むクレブスーリンゲル重炭酸緩衝液 1.58 ml および、参考例 6 で得られる ¹²⁵I 標識ヒト TNF (140 Ci/mol、1.4 nCi/ml) を 20 μl を加えた試験管を 2 本用意する。その中の 1 本に非標識のヒト TNF (50 μM) 200 μl を加え、他の 1 本にリン酸緩衝液を 200 μl 加えて、それぞれよく混合し、24℃ で 30 分間静置する。次いで得られる混合液それぞれに、あらかじめ氷冷しておいた 0.1% ウシγグロブリンを含む 0.1 リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 2 ml を加え、さらに、あらかじめ氷冷しておいた 25% ポリエチレングリコールを含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液

(pH 7.4) 2 ml を加えて、十分に攪拌し、15 分間氷冷する。これらをそれぞれセルロースアセテート (EH) ミリポアフィルターで濾過した後、8% ポリエチレングリコールを含む 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 30 ml で洗浄し、各々のフィルターに保持された¹²⁵I の放射活性をオートγ-カウンターで測定する。その結果、非標識ヒト TNF を添加する場合の非特異な結合によるカウントが 1250 dpm であるのに対し、非標識ヒト TNF を添加しない場合のカウントは 10,500 dpm であり、得られる精製画分のヒト TNF に対する特異結合能が確認される。

実施例 2

工程 1 (TNF の受容タンパクを含有する膜画分の抽出)

ピペッティングでシャーレから回収した MJ-841 細胞 1×10^8 個を細胞洗浄液 (0.05 M ホウ酸、0.15 M 塩化ナトリウム、1 mM 塩化マグネシウムおよび 1 mM 塩化カルシウムからなる溶液を 1 M 水酸化ナトリウムで pH 7.2 にしたも

の) 40 ml に懸濁し 4℃ で、450 g、5 分間、遠心分離することにより洗浄した後、抽出溶液 (0.02 M ホウ酸、0.2 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸塩) からなる溶液を 1 M 水酸化ナトリウムで pH 10.2 に調整したもの) 20 ml に懸濁する。これを -20℃ で凍結し 37℃ で融解すること (凍結融解) を 3 回繰返し、更にウルトラソニック社 (米国) の W-225 R 型超音波破砕器で 40~50 ワット 1 分間超音波処理する。これに 0.5 M ホウ酸水溶液 160 ml を加えよく攪拌し、2 枚重ねのナイロンガーゼで濾過して大きな細胞塊を除去する。この濾液を 2℃、450 g で 10 分間遠心分離して得られる上清をさらに 2℃ で、12,000 g 30 分間遠心分離する。その沈渣をリン酸緩衝液 2.5 ml に懸濁した後、3% ショ糖を含むリン酸緩衝液 3 ml の上に重層して、2℃ で 24,000 g、1 時間遠心分離する。その重層界面に濃縮される膜画分をリン酸緩衝液 800 μl に懸濁し、2℃ で 100,000 g、10 分間超遠心する。得られる沈渣は約 200 μl である。

工程 2 (ゲル濾過)

工程 1 で得られる膜画分 20 ml を 200 ml の 1% n-オクチル-β-D-グリコシドで可溶化したものを、あらかじめ 0.15 M 塩化ナトリウム、0.5% n-オクチル-β-D-グリコシドを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したセファクリル S-200 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (7000 ml、直径 10 cm x 高さ 90 cm) に添加した後、同緩衝液で溶出し、分子量 8 万から 11 万の画分 400 ml を分取する。これを通常の方法によりホロファイバー膜 (分子量カット 6000) で 40 ml にまで濃縮する。

工程 3 (アフィニティークロマトグラフィー)

工程 2 で得られるサンプルをあらかじめ上記緩衝液で平衡化した TNF 結合セファロース CL-6B カラム (TNF 3 μg/ml ゲル結合) (4 ml、直径 0.9 cm x 高さ 6.3 cm) に添加し、20 倍量

の同緩衝液で洗浄した後、TNF 100 U/ml を同緩衝液で溶出する (溶出画分 6 ml)。

工程 4 (ゲル濾過)

前記精製工程で得られる溶出液を、あらかじめ 3 M KCl、0.5% n-オクチル-β-D-グリコシドを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で平衡化したセファクリル S-200 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (160 ml、直径 1.5 cm x 高さ 90 cm) に添加した後、同緩衝液で溶出し、分子量 8 万から 11 万の画分 10 ml を分取する。次いでこの画分をセントリコン (アミコン社、米国分子量 1 万カット) で濃縮して 1 ml とし、これをあらかじめ 0.15 M NaCl、0.5% n-オクチル-β-D-グリコシドを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したセファデックス G-25 (ファルマシア社、スウェーデン) カラム (6.4 ml、直径 0.9 cm x 高さ 10 cm) に添加し、脱塩を行ない、1.5 ml の精製画分を得る。この精製画分の 200 μl に、0.1% ウシ胎児アルブミンを含むクレブスーリン

ゲル重炭酸緩衝液1.58 ml および、参考例6で得られる¹²⁵I 標識ヒトTNF (140Ci/mol, 1.4μCi/ml) を20 μl を加えた試験管を2本用意する。その中の1本に非標識のヒトTNF (50 μM) 200 μl を加え、他の1本にリン酸緩衝液を200 μl 加えて、それぞれよく混合し、24℃で30分間静置する。次いで得られる混合液それぞれに、あらかじめ氷冷しておいた0.1% ウォッシュグロブリンを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 2 ml を加え、さらに、あらかじめ氷冷しておいた2.5% ポリエチレングリコールを含む0.1 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 2 ml を加えて、十分に攪拌し、15分間氷冷する。これらをそれぞれセルロースアセテート (EH) ミリポアフィルターで通過した後8% ポリエチレングリコールを含む0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 30 ml で洗浄し各々のフィルターに保持された¹²⁵I の放射活性をオートカウンターで測定する。その結果、非標識ヒトTNF を添加する場合の非特異な結合によるカウントが98

0 dpm であるのに対し、非標識ヒトTNF を添加しない場合のカウントは11,050 dpm であり、得られる精製画分のヒトTNF に対する特異結合能が確認される。

4. 図面の簡単な説明

第1図はL-M細胞のTNF存在下(a)及び非存在下(対照)(b)、及びL-R細胞のTNF存在下(c)及び非存在下(対照)(d)における免疫染色の結果を示す光学顕微鏡写真(×300)を示す。第2図はL-M細胞受容タンパクをヒトTNF非存在下(対照)(a)及びヒトTNF存在下(b)にリン酸化したもののオートラジオグラフを示す。第3図はL-M細胞受容タンパクとヒトTNFの架橋複合体のオートラジオグラフを示す。第4図はL-M細胞を含む培地に加えたヒトTNF濃度とL-M細胞受容タンパクに結合したヒトTNF量との関係を示すグラフである。第5図は第4図において示されるヒトTNFとL-M細胞受容タンパクとの特異的結合についてのスキッチャード

プロット解析結果を示すグラフである。第6図はMJ-841細胞を含む培地に加えたヒトTNF濃度とMJ-841細胞受容タンパクに結合したヒトTNF量との関係を示すグラフである。第7図は第6図において示されるヒトTNFとMJ-841細胞受容タンパクとの特異的結合についてのスキッチャードプロット解析結果を示すグラフである。第8図はウサギ生理活性ポリペプチドをコードするDNAを各々含有するプラスミドインサートの制限酵素地図である。第9図は従来のウサギ生理活性ポリペプチドをコードする組換えDNA(pTNF-lac-1)の調製方法を示すフローシートである。第10図はウサギ生理活性ポリペプチドをコードするもう一つの組換えDNA(pTNF-lac-UV5-1)の調製方法を示すフローシートである。第11図はヒト生理活性ポリペプチドの遺伝子を含有するプラスミドの一部分の制限酵素地図である。第12図はウサギ生理活性ポリペプチドの遺伝子を含有するプラスミドの一部分の制限酵素地図である。第13図はヒト生理活性ポ

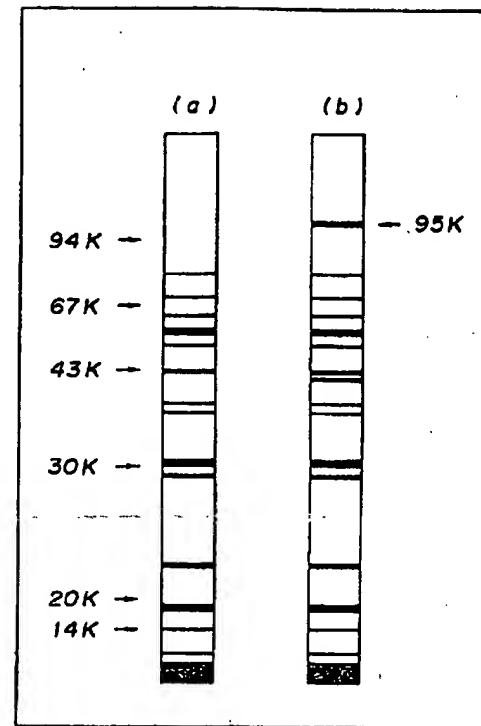
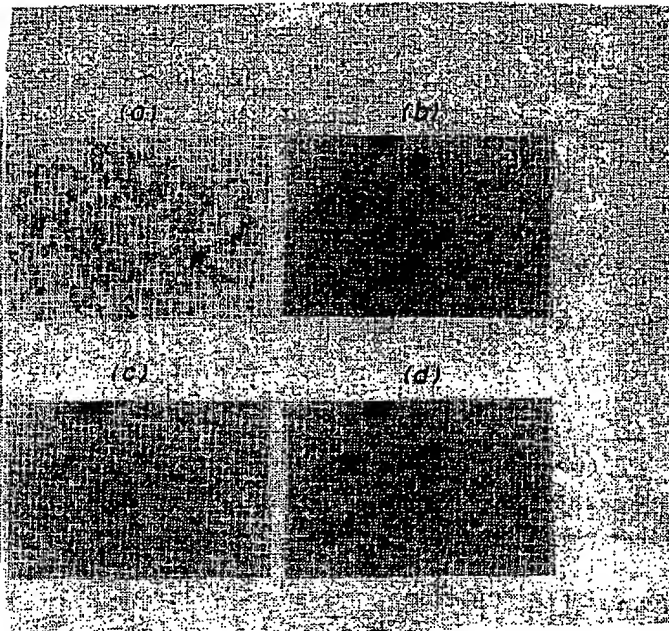
リペプチドをコードする組換えDNA(pHTNF-lacUV5-1)の調製方法を示すフローシートである。第14図はヒト生理活性ポリペプチドをコードするもう一つの組換えDNA(pHTNF-lacUV5-2)の調製方法を示すフローシートである。

特許出願人 旭化成工業株式会社

図面の浄書(内容に変更なし)

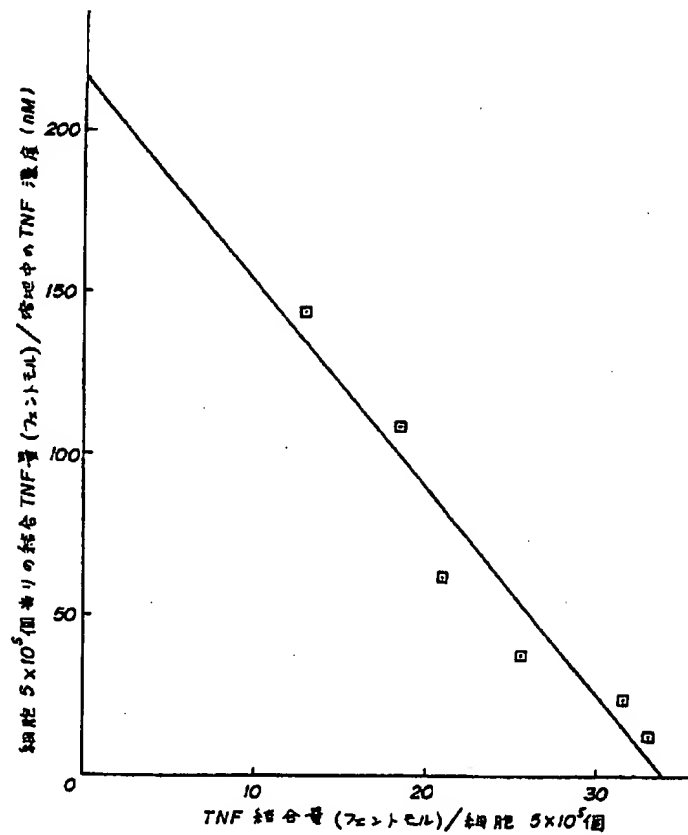
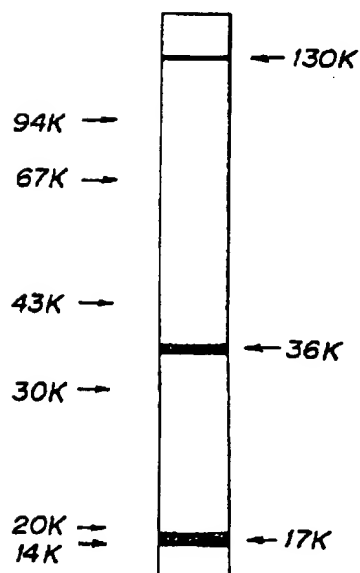
第 2 図

第 1 図

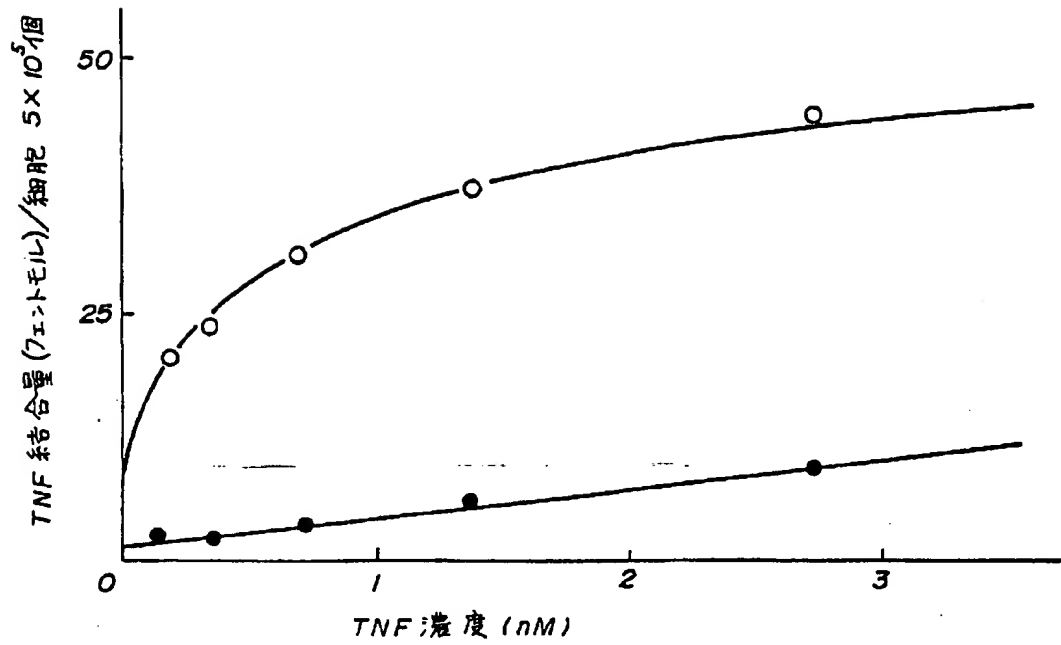


第 5 図

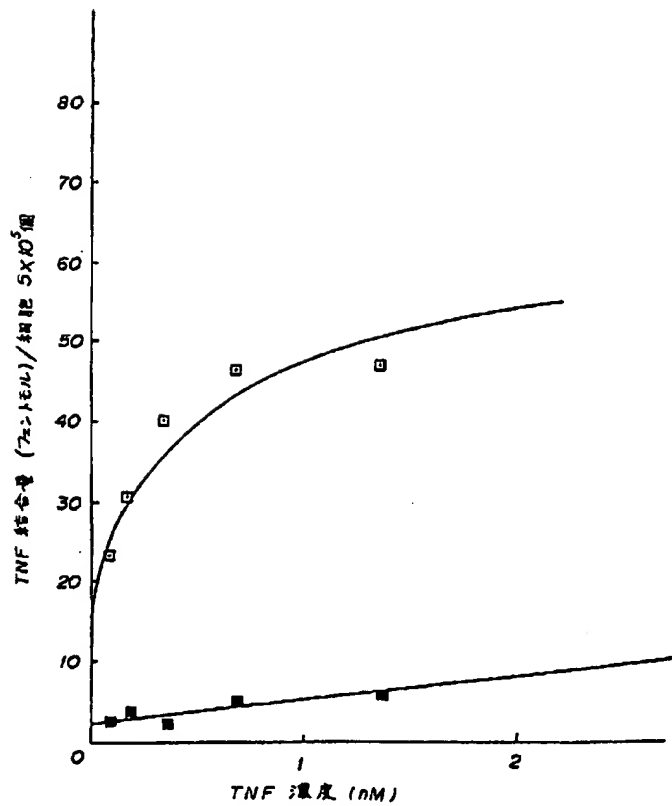
第 3 図



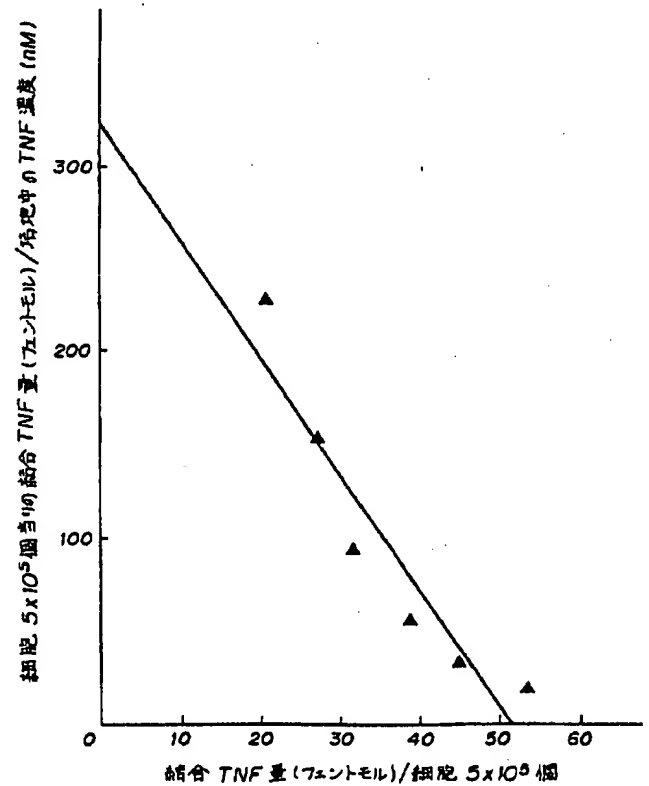
第4図



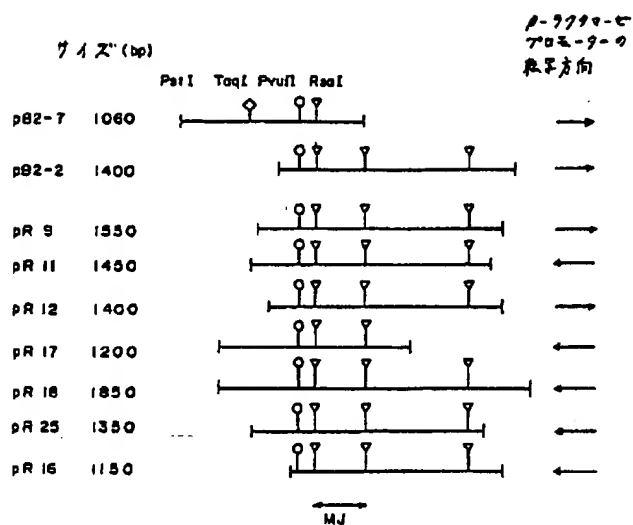
第6図



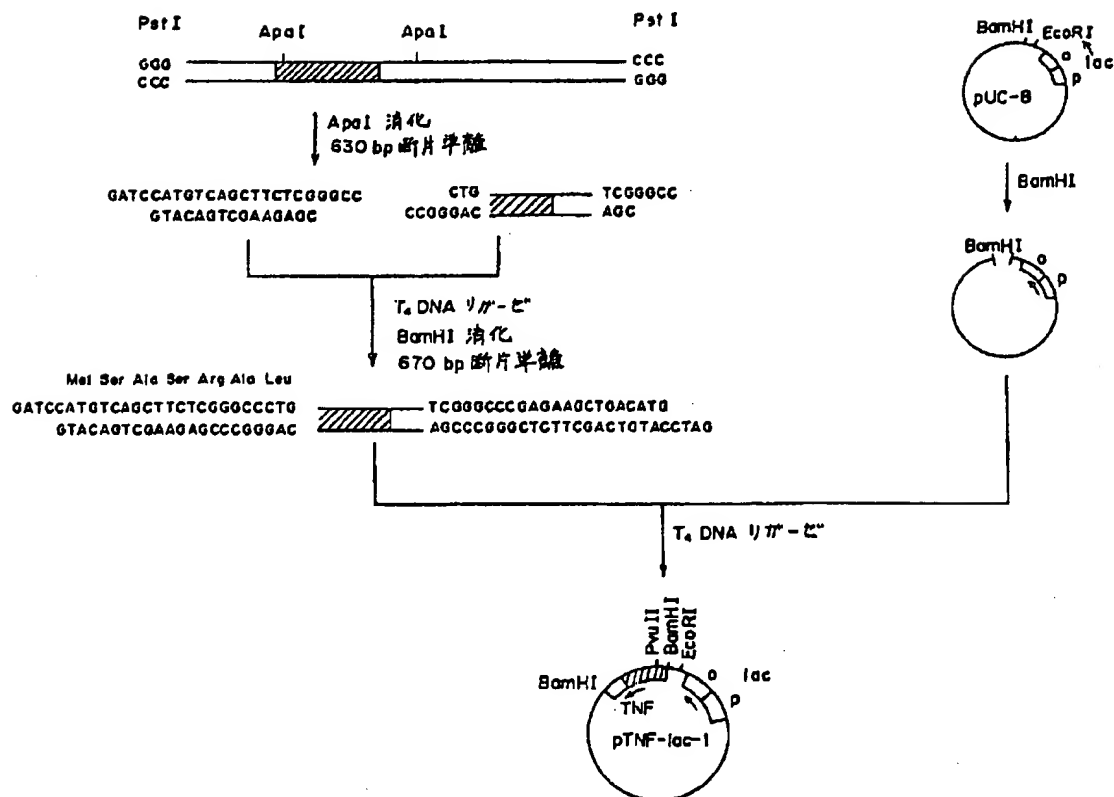
第7図



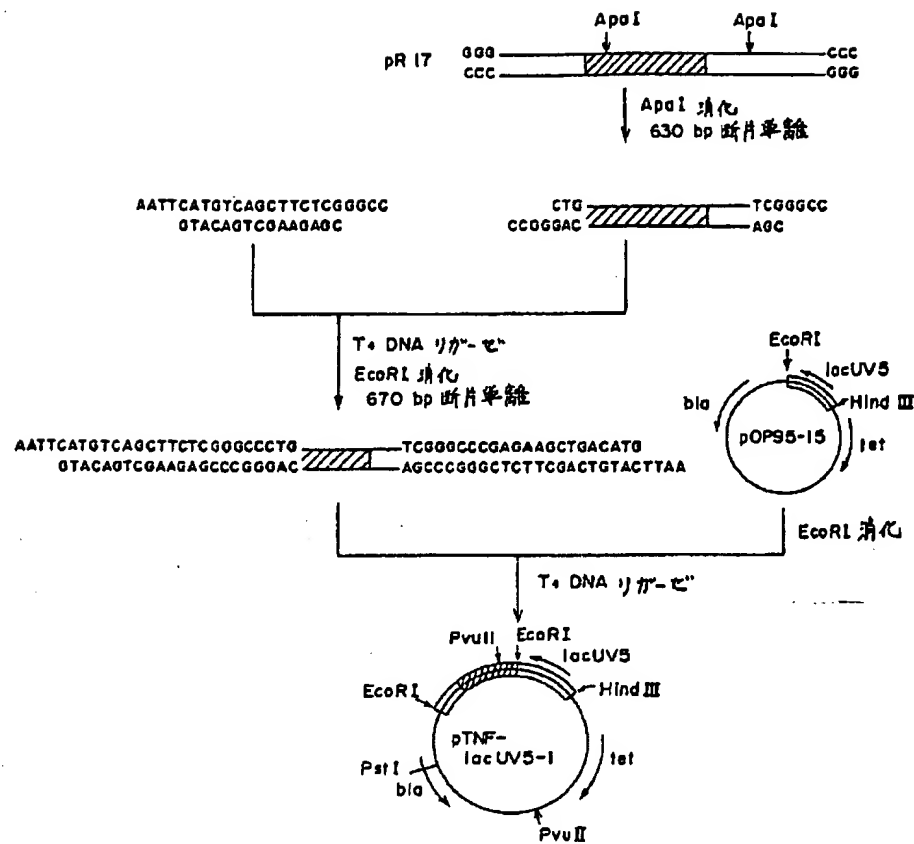
第 8 図



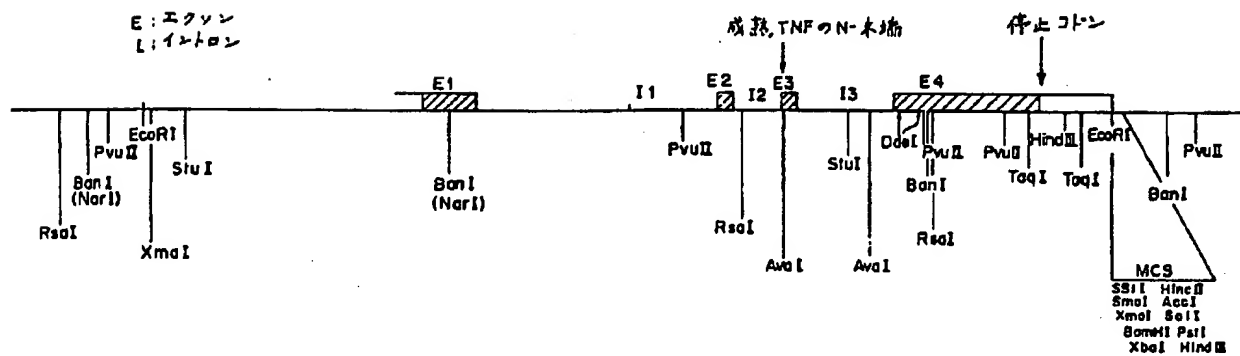
第 9 図



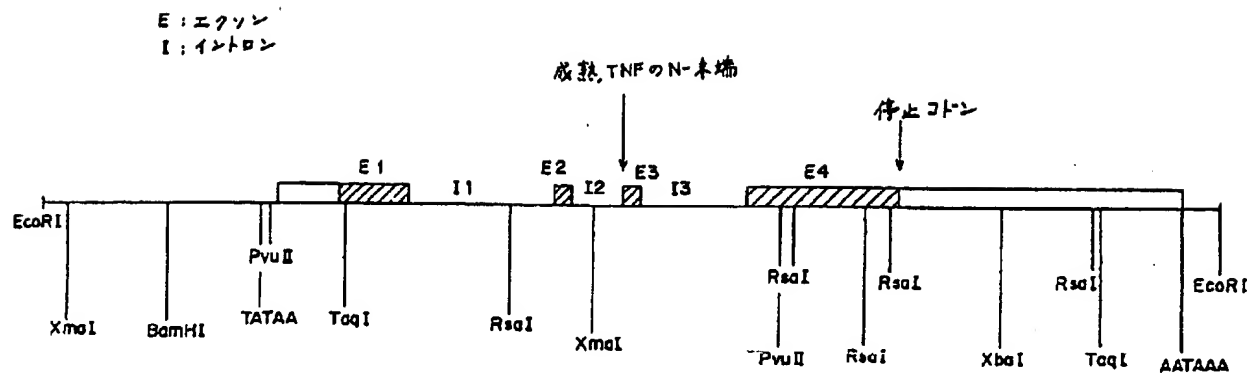
第10図



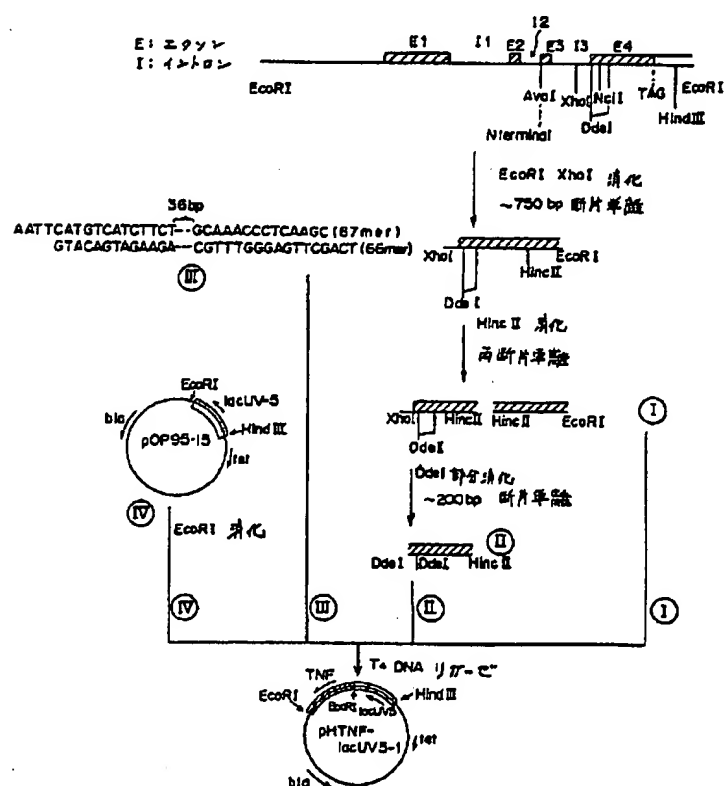
第11図



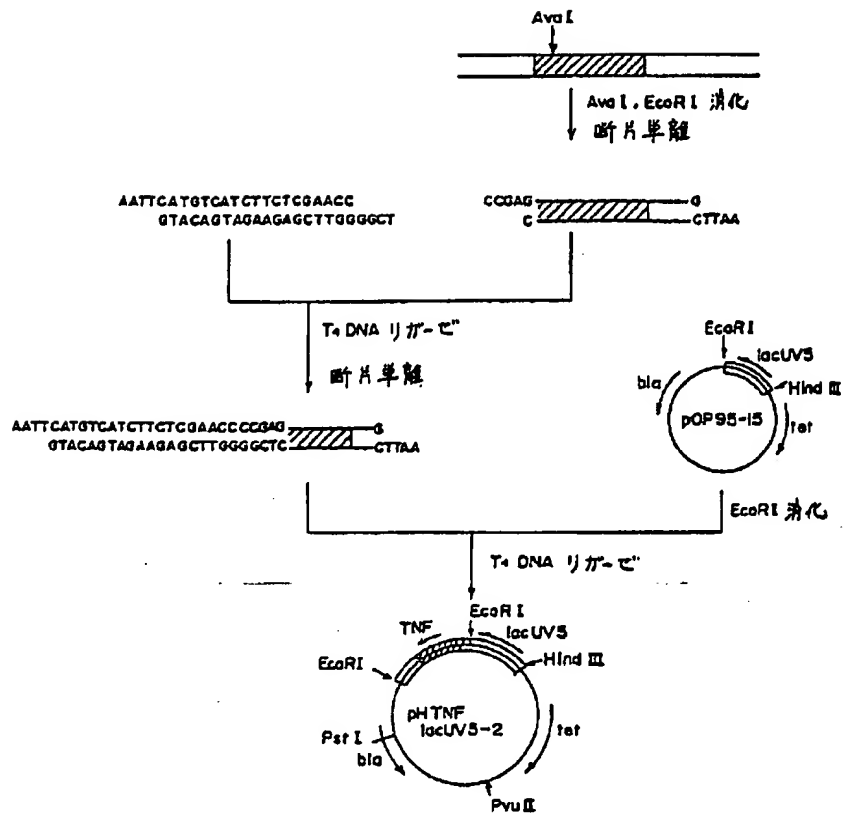
第 12 図



第 13 図



第14図



手続補正書(方式)

昭和60年10月22日

特許庁長官 宇賀道郎 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第136728号

2. 発明の名称

生理活性物質の受容タンパク

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒530

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

名称 (003) 旭化成工業株式会社

代表取締役社長 世古真臣

4. 補正命令の日付

昭和60年9月24日(発送日)

5. 補正の対象

図面

6. 補正の内容

別紙の通り